N° d'ordre : 51

THESE

présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE 3e CYCLE

Mention

SCIENCES ET TECHNIQUES EN PRODUCTION ANIMALE

par

Sylviane TACHÉ

o o o

Recherches sur les conditions de formation de l'ochratoxine A et de la patuline dans les saucissons secs

* *

Soutenue le 4 Octobre 1979 devant le Jury composé de :

MM. RAYNAUD — Président

LABIE
LABOUCHE
CANDAU
GALTIER
} Membres

N° d'ordre : 81

THESE

présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE 3e CYCLE

Spécialité : Microbiologie et Sciences des Aliments

par

Sylviane TACHE

I.N.S.A.

Recherches sur les conditions de formation de l'ochratoxine A et de la patuline dans les aliments secs

Soutenue le 4 Octobre 1979 devant le Jury composé de :

MM.	RAYNAUD	Président
	LARIE	Membres
	LASCOMBES	
	CANDAU	
	GAUTIER	

N° d'ordre : 51

THESE

présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE 3e CYCLE

Mention

SCIENCES ET TECHNIQUES EN PRODUCTION ANIMALE

par

Sylviane TACHÉ

o o o

Recherches sur les conditions de formation de l'ochratoxine A et de la patuline dans les saucissons secs

* *

Soutenue le 4 Octobre 1979 devant le Jury composé de :

MM. RAYNAUD — Président

LABIE
LABOUCHE
CANDAU
GALTIER
} Membres

UNIV.
LEIDEN
BIB.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

PRESIDENT D'HONNEUR

M. le Professeur ESCANDE
Membre de l'Institut

PRESIDENT

M. le Professeur MONTEL

VICE-PRESIDENTS

M. MARTY	Professeur
M. ENJALBERT	Professeur sans chaire
M. CONSTANT	Maître de Conférences
M. ANDRE	Maître Assistant

Directeur de l'E.N.S.A.T.	Monsieur le Professeur RAYNAUD
Directeur de l'E.N.S.C.T.	Monsieur le Professeur VOIGT
Directeur de l'E.N.S.E.E.I.H.T.	Monsieur le Professeur NOUGARO
Directeur de l'I.G.C.	Monsieur le Professeur GARDY

SECRETAIRE GENERAL

M. CRAMPES

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ESCANDE	- Membre de l'Institut
M. DIEHL	
M. DUPIN	

PROFESSEURS

M. ANGELINO	Génie Chimique
M. BUGAREL	Génie Chimique
M. DAT	Mécanique
M. GARDY	Génie Chimique
M. GRUAT	Mécanique
M. HOFFMANN	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MARTY	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MONTEL	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M. NOUGARO	Mécanique
M. THIRRIOT	Mécanique
M. VOIGT	Chimie Minérale

.../.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523709_0020

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Melle	BERDUCOU	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques
M.	CALMON	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques
M.	DABOSI	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M.	ENJALBERT	Génie Chimique
M.	FABRE	Mécanique
M.	FALLOT	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques
M.	GILOT	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M.	LEFEUVRE	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	MATHIEU	Chimie Analytique Appliquée et Chimie des Matériaux
M.	TRANNOY	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	TRUCHASSON	Mécanique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	ALBERTINI	Sciences Agronomiques
M.	BAJON	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	BAUDRAND	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	BOURGEAT	Minéralogie, Géochimie, Pétrographie et Géologie Appliquée
M.	BRUEL	Informatique fondamentale et appliquée
M.	BUIS	Biologie et Physiologie végétale
M.	CANDAU	Biologie et Biochimie Appliquée, Sciences Agronomiques
M.	CONSTANT	Chimie minérale
M.	COSTES	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	COUDERC	Génie Chimique
M.	ECOCHARD	Biologie et Biochimie Appliquée, Sciences Agronomiques
M.	FOCH	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	GASET	Chimie Organique Appliquée et Chimie des Matériaux
M.	GOURDENNE	Chimie Physique
M.	LABAT	Biologie et Biochimie Appliquée, Sciences Agronomiques
M.	LENZI	Chimie APpliquée et Chimie des Matériaux
M.	MASBERNAT	Mécanique
M.	MATHEAU	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	MORELIERE	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	TERRON	Zoologie et Ecologie

Liste établie le 24 janvier 1979

A DOMINIQUE

A NOS PARENTS

A TOUS NOS AMIS

Monsieur le Professeur RAYNAUD

m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur LABIE

m'a permis de mener à bien ce travail par les conseils judicieux et les encouragements qu'il m'a prodigués. Qu'il veuille trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur LABOUCHE,

Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements pour l'amabilité avec laquelle il m'a toujours accueillie dans son laboratoire. Le stage effectué à la Station de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse a été riche d'enseignements et m'a permis de réaliser ce travail dans des conditions très favorables.

Monsieur le Professeur CANDAU

m'a fait l'honneur de siéger dans ce jury. Qu'il soit également remercié pour la qualité de l'enseignement qu'il m'a dispensé.

Monsieur GALTIER

Chargé de Recherches à l'I.N.R.A., a bien voulu s'intéresser à mes travaux, et sa compétence en matière de mycotoxicologie m'a souvent été d'un grand recours. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier :

Mademoiselle G. LARRIEU

dont les connaissances techniques et l'expérience m'ont apporté une aide efficace dans la mise au point de méthodes d'extraction des mycotoxines.

Madame G. BENARD

Maître Assistant, qui est intervenue au niveau de la mise en place d'un protocole expérimental et a facilité mes recherches bibliographiques.

Et tous les membres du personnel du Laboratoire d'H.I.D.A.O.A. dont l'amitié m'a toujours été d'un profond réconfort.

• • •

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, que dirige Monsieur le Professeur LABIE.

Ce travail a été exécuté grâce aux fonds de la Convention de Recherche n°7709, subventionnée par le Ministère de la Qualité de la Vie.

PLAN

. Introduction.

. Chapitre I : STRUCTURE, PRODUCTION ET EFFETS TOXIQUES DES PRINCIPALES MYCOTOXINES.

II. Aflatoxines et dérivés.

1°- Aflatoxines.
2°- Stérigmatocystine.

II. Les mycotoxines de l'espèce Penicillium.

1°- Ochratoxines.
2°- Patuline.
3°- Citrinine.
4°- Citréoviridine.
5°- Rubratoxines A et B.
6°- Acide pénicillique.
7°- P.R. toxine.
8°- Autres toxines.

III. Les mycotoxines trémorgéniques.

IV. Les mycotoxines de Fusarium.

1°- Zéaralénone.
2°- Trichothécènes.

V. Les mycotoxines de Stachybotrys.

VI. Les mycotoxines de Claviceps (l'Ergotamine).

VII. Sporidesmines.

VIII. Slaframine.

. Chapitre II : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LES MOISISSURES ET LES MYCOTOXINES DANS LES DENREES D'ORIGINE ANIMALE CONSERVEES PAR SALAISON.

I. Rôle des moisissures au cours de la maturation des viandes salées.

1°- Rôle favorable des moisissures.
2°- Altérations des produits par les moisissures indésirables.

II. Facteurs influençant le développement des moisissures et la production de mycotoxines dans les viandes salées et séchées.

1°- La souche.
2°- Influence de la température.

3° - Rôle de l'humidité et de l'activité hydrique du substrat.
4° - La durée de la culture.
5° - La nature du substrat.
6° - L'aération et la composition de l'atmosphère.
7° - Le pH du milieu.
8° - Les interactions entre espèces présentes sur un même substrat.

III. Comportement toxinogène des moisissures présentes à la surface des produits carnés conservés par salaison.

A. Identification des moisissures isolées des produits de charcuterie.

1° - Classification en genres.
2° - Classification des moisissures appartenant au genre Penicillium.
3° - Classification des moisissures appartenant au genre Aspergillus.

B. Mise en évidence du pouvoir toxinogène des souches.

1° - Culture sur milieu synthétique.
2° - Test de l'embryon de poulet.
3° - Résultats.

C. Ensemencement sur saucisson et sur jambon de campagne des souches reconnues toxinogènes et recherche des mycotoxines.

1° - Echantillons soumis à des conditions normales d'étuvage et de maturation.
2° - Recherche des conditions favorables à l'élaboration de toxines.

a. Aflatoxines.
b. Ochratoxine A.
c. Citrinine.
d. Patuline.
e. Stérigmatocystine.

3° - Conclusions.

IV. Moyens de lutte contre la présence de moisissures indésirables à la surface des salaisons.

1° - Utilisation d'épices stérilisées.
2° - Ensemencement par des moisissures sélectionnées.
3° - Fumage.
4° - Importance de l'enveloppe du saucisson.

. Chapitre III : RECHERCHES SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE ET LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A D'UNE SOUCHE D'ASPERGILLUS OCHRACEUS, ENSEMENCEE SUR DES SAUCISSONS.

I. Choix d'un mode d'extraction de l'ochratoxine A, à partir du saucisson.

1°- Rappel des propriétés physicochimiques de l'ochratoxine A.
2°- Application de méthodes d'extraction déjà connues.

a. Se rapportant à l'aflatoxine B_1 (BULLERMAN, JEMMALI, BROWN).
b. Se rapportant à l'ochratoxine A (CHU, GALTIER).

3°- Mise au point d'un mode d'extraction de l'ochratoxine A à partir du saucisson.

a. Contamination des échantillons.
b. Extractions comparées.
c. Chromatographie des extraits A et B sur couche mince.
d. Résultats.
e. Discussion et choix définitif.

II. Etude du développement de l'Aspergillus ochraceus et de la production d'ochratoxine A, dans le cas du saucisson.

A. Préparation des échantillons.

1°- Préparation des spores.

a. Activation.
b. Contrôle de production.

2°- Inoculation.
3°- Culture.

B. Détermination des conditions favorables au développement de la moisissure et à sa toxinogenèse sur le saucisson.

1°- Conditions de culture.
2°- Importance de l'H. P. D.

a. Protocole expérimental
- Dosage de l'H. P. D.
- Contrôle de la production d'ochratoxine A sur les 4 tranches prélevées de chaque saucisson.

b. Résultats.
e. Discussion.

C. Production d'ochratoxine A, dans des conditions se rapprochant de celles normalement utilisées en industrie.

1°- Schéma des différentes opérations intervenant dans la fabrication des saucissons secs.
2°- Incidences d'un étuvage à 22°C.
3°- Incidences d'un étuvage à 24°C.

III. Etude de la variation du taux de toxine au cours de la maturation

1°- Variation du taux d'ochratoxine A sur des échantillons de saucisson pré-contaminés.
2°- Stabilité de la toxine dans le saucisson.

. Chapitre IV : RECHERCHES SUR LA PRODUCTION DE PATULINE DANS DES SAUCISSONS CONTAMINES PAR UNE SOUCHE DE PENICILLIUM GRANULATUM.

I. Caractéristiques de la patuline.

1°- Propriétés physicochimiques de la patuline.
2°- Production de patuline sur milieu de culture liquide.

II. Mode d'extraction de la patuline à partir du saucisson.

1°- Extraction directe.
2°- Purification selon différents procédés :

- STOLOFF
- POHLAND
- TAUCHMAN

3°- Chromatographie.
4°- Identification de la toxine.
5°- Observation des chromatogrammes.
6°- Mise au point d'un mode d'extraction plus efficace.

III. Etude du comportement de Penicillium granulatum sur le saucisson.

1°- Stabilité de la patuline dans le saucisson.
2°- Production de patuline par P. granulatum ensemencé sur le saucisson.

. Conclusion générale.

. Bibliographie.

INTRODUCTION

Les mycotoxines, substances extracellulaires zootoxiques (et plus rarement phytotoxiques) élaborées par les moisissures ont été identifiées à la suite d'accidents (mycotoxicoses) survenus chez des animaux alimentés avec des produits moisis. Deux cas seront cités :

- en France, l'année 1959 fut particulièrement sèche et certains éleveurs se sont équipés en germoirs à fourrage ; une température de 30°C et une solution nutritive appropriée permettaient l'obtention de plantules de céréales en quelques jours. Mais des accidents se produisirent, entraînant la mort des bovins. Une analyse microscopique montra que l'Aspergillus clavatus était en cause, car il élabore une substance toxique : la patuline ;

- en Angleterre, à peu près à la même époque, on nota la mort de 100 000 dindonneaux nourris par des tourteaux d'arachide moisis, les toxines d'Aspergillus flavus étaient responsables de cette mortalité massive.

Dès lors, l'opinion a été sensibilisée aux dangers de l'envahissement fongique des aliments du bétail et de ceux de l'Homme. De plus, les conditions actuelles de l'alimentation supposent un stockage annuel de quantités considérables de produits alimentaires et, malgré une amélioration technologique constante dans la conservation de ces denrées, il en résulte une augmentation des risques d'altérations par des moisissures, dont la conséquence la plus grave est représentée par les dangers d'intoxication par des dérivés toxiques élaborés par des champignons et capables de diffuser dans l'aliment et dans l'organisme du consommateur.

Il devenait intéressant de détecter la présence de moisissures dans les ensilages, les fourrages, les tourteaux d'arachide, les aliments susceptibles d'être moisis et, par suite d'isoler, de répertorier les souches, de tester leur éventuel pouvoir toxigène et enfin, de connaître les conditions écologiques de développement et de toxinogenèse. Il est également important

de déterminer la fréquence de la contamination et le taux des mycotoxines présentes à l'état spontané dans divers substrats.

Or, la surface des denrées alimentaires d'origine animale conservées par salaison (telles que les jambons de campagne et les saucissons) se recouvre naturellement, au cours de la maturation, d'un enduit formé de moisissures, levures et bactéries, qui constituent la "fleur" du produit. Un aspect positif de cette "fleur" est illustré par le fait que, comme l'indique PALLU [65], les moisissures vertes ou blanches seraient favorables à un séchage progressif, une bonne tenue de coupe et une aromatisation des produits. Mais on peut se demander si, parmi les moisissures présentes, certaines d'entre elles ne possèdent pas un caractère toxinogène et pourraient de ce fait produire leurs toxines si elles rencontrent des conditions favorables, rendant la denrée contaminée dès lors dangereuse pour le consommateur. Cette préoccupation constituera le thème principal de ce travail.

CHAPITRE I

STRUCTURE, PRODUCTION ET EFFETS TOXIQUES DES PRINCIPALES MYCOTOXINES

-:-:-

I. Aflatoxines et stérigmatocystine.

II. Les mycotoxines de l'espèce Penicillium (dont l'ochratoxine A et la patuline).

III. Les toxines trémorgéniques.

IV. Les toxines de Fusarium.

V. Les mycotoxines de Stachybotrys.

VI. Les mycotoxines de Claviceps.

VII. Les sporidesmines.

VIII. La slaframine.

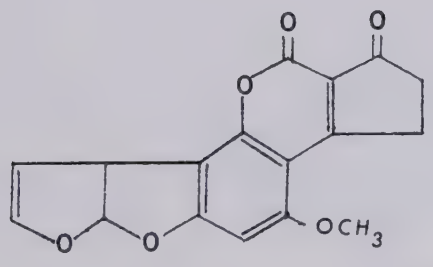
Au cours de cette revue bibliographique concernant les principales mycotoxines, nous considèrerons pour chacune d'elles les caractéristiques suivantes : a. espèces fongiques productrices ;

b. sources naturelles et substrats contaminés ;

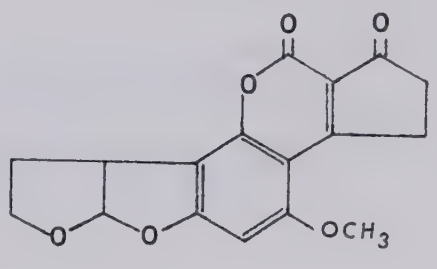
c. symptômes caractéristiques et mode d'action.

I. AFLATOXINES ET DERIVES

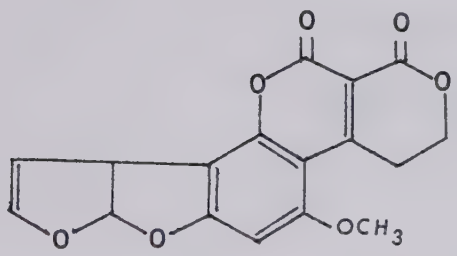
1°- Aflatoxines.



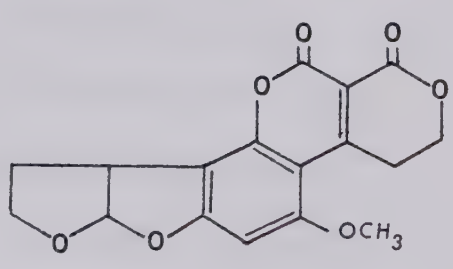
Aflatoxine B_1



Aflatoxine B_2



Aflatoxine G_1



Aflatoxine G_2

Les aflatoxines B_1, B_2, G_1, et G_2 sont les plus importantes ; elles se distinguent par une fluorescence différente sous lumière ultraviolette. Les aflatoxines B_1 et B_2 possèdent une fluorescence bleue alors que G_1 et G_2 fournissent une fluorescence verte [2].

a. Les aflatoxines sont produites par les moisissures appartenant au groupe Aspergillus flavus et A. parasiticus.

b. Les aflatoxines ont été décelées sur l'arachide, le maïs, le soja, le blé, les graines de coton, le tournesol, le sorgho, les noix et amandes. On retrouve l'aflatoxine M_1 (associée à la caséine) dans le lait de vache.

c. Les aflatoxicoses se manifestent essentiellement par une atteinte du foie et des reins de nombreux animaux [43, 63, 12] et de l'homme ; PHILIPS et coll. [66] ont retrouvé 520 µg d'aflatoxine B_1 par gramme de foie humain.

Les symptômes caractéristiques sont l'inappétence et un ralentissement de la croissance.

Il y a surcharge graisseuse des cellules hépatiques, pouvant aller jusqu'à leur destruction avec nécrose totale du parenchyme hépatique. Il peut se produire un phénomène congestif au niveau des poumons. On note également une prolifération des cellules épithéliales du canal cholédoque.

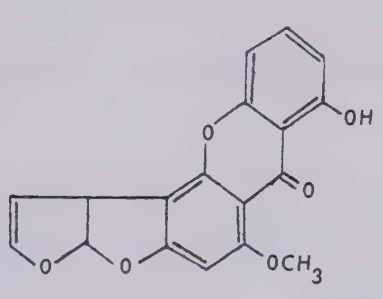
La toxicité de ces mycotoxines pour différents animaux est définie par les DL_{50} mesurées après absorption par voie orale.

Animal	DL 50	
	Aflatoxine B_1	Aflatoxine G_1
Caneton	$<$0,4 mg/kg	1,2 mg/kg
Rat	5,55 mg/kg ♂ et 7,44 mg/kg ♀	
Jeune lapin	0,2 à 0,4 mg/kg	
Porc	5 à 10 mg/kg	
Bovin	$>$10 mg/kg	

d. Les effets de ces mycotoxines se situent essentiellement au niveau de la synthèse protéique : chez le rat, une dose de 5 mg/kg provoque un arrêt immédiat de la synthèse protéique. L'aflatoxine inhibe fortement l'activité de la RNA polymérase ; de plus, les résultats d'études réalisées in vitro suggèrent que les groupes purines et amines jouent un rôle important

dans l'interaction aflatoxine-DNA. Une expérimentation in vitro a montré que l'aflatoxine B_1 a une spécificité au niveau des protéines du foie, alors que pour l'aflatoxine G1, c'est l'ARN du foie (il s'agit d'une liaison covalente).
Les aflatoxines B_1 et G_2 se lient également avec les acides aminés et les protéines d'organes de rat, de façon covalente [18].

2° - Stérigmatocystine.



Stérigmatocystine

a. Elle est produite par de nombreux Aspergillus dont A. versicolor et A. nidulans.

b. On la retrouve dans les grains, les confitures et les jus de fruits, dans les viandes séchées, les céréales et le pain.

c. Elle est essentiellement hépatoxique, mais peut provoquer des lésions du rein [2] ; elle cause également des lésions de la peau [71]. La stérigmatocystine inhibe la synthèse d'ARN dans le foie du rat ; elle augmente l'activité des déoxyribonucléases et induit des altérations morphologiques par fragmentation nucléolaire, inhibition de la mitose.
Cette mycotoxine possède des propriétés mutagènes [2].

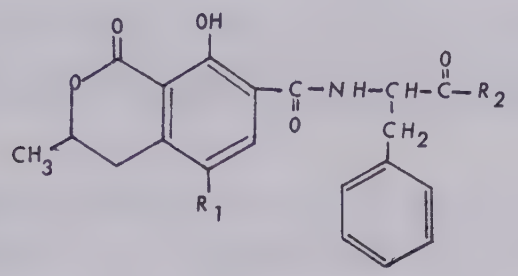
Doses létales :

- chez le rat, par injection intrapéritonéale, la DL_{50} = 120 à 166 mg/kg ;
- chez le singe, pour un même type d'injection, la DL_{50} = 32 mg/kg ;
- chez la jeune souris, la dose maximale tolérée est égale à 5 μg/g de poids vif [24].

II. LES MYCOTOXINES DES PENICILLIUM

Parmi celles-ci, l'ochratoxine A et la patuline seront plus longuement traitées, car elles feront l'objet de nos expérimentations sur les salaisons.

1°- Ochratoxines.



Ochratoxine A : R_1 = Cl, R_2 = OH
Ochratoxine B : R_1 = H, R_2 = OH
Ochratoxine C : R_1 = Cl, R_2 = $CH_2\,CH_3$
Ochratoxine D : R_1 = Cl, R_2 = CH_3

a. Les principales espèces productrices appartiennent aux genres Aspergillus et Penicillium : A. ochraceus, A. ostianus, A. sulfureus, A. sclerotiorum, A. alliaceus, A. melleus, A. petrakii, P. viridicatum, P. variabile, P. cyclopium, P. commune, P. purpurescens.

b. Ces moisissures se développent généralement sur les céréales (orge, maïs, avoine) ainsi que sur l'arachide et même le café. Quelques souches ont également été retrouvées sur des produits carnés conservés par salaison [46].

c. La toxicité de l'ochratoxine A a été étudiée chez de nombreux animaux. L'intoxication est caractérisée par une nécrose des tissus hépatiques, par des hémorragies et par une atteinte du rein avec modifications de la fonction rénale.

Chez la souris et le rat, GALTIER [27, 28] note des effets néphrotoxiques. La croissance pondérale diminue et la toxine s'accumule dans l'organisme.

Chez le poulet [32, 70], on note une ataxie, une prostration et de la diarrhée.

TRACKER [95] montre chez le porc, une diminution de poids proportionnelle à la dose d'ochratoxine A injectée et une étude histologique met en évidence des altérations rénales avec dégénérescence et nécrose de l'épithélium tubulaire, ainsi que des congestions, nécroses et œdèmes des tissus lymphoïdes (rate, thymus...).

Quelques valeurs de DL_{50} permettent d'évaluer la toxicité de la toxine chez différents animaux :

Animal	Valeurs de DL_{50}			Références
	Ochratoxine A	Ochr. B	Ochr. C	
Embryon poulet	10 à 15 µg/œuf			Gedek [1972]
Canard	150 µg/animal			Purchase [1967]
Poussin	125 µg/animal	1,8 mg/animal	216 µg/animal	Peckham [1971] Chu [1971]
Rat	22 mg/kg ♂ et 20 mg/kg ♀			Purchase [1968]
Porc	9,1 mg/kg ♂ et 81 mg/kg ♀			Tracker [1977] [95]

d. Interactions des ochratoxines avec les protéines.

L'ochratoxine A se lie à plusieurs protéines : l'albumine sérique bovine, l'aldolase, l'arginase, la thrombine et les catalases, mais elle ne se lie pas avec l'ADN, l'ARN et les γ-globulines.

L'albumine paraît être le transporteur principal de la toxine dans l'organisme [30]. L'étude sur la liaison "ochratoxine A - albumine sérique bovine" réalisée par des analyses spectrophotofluorométriques et de dialyse à l'équilibre révèlent que ce sont à la fois des liaisons hydrophobes et des liaisons ioniques qui interviennent dans l'interaction [18].

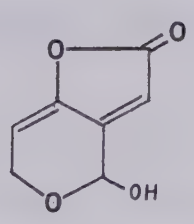
Compte tenu de l'existence de ces forces de liaison, on met au point une méthode rapide pour diagnostiquer, in vivo, les ochratoxicoses : il s'agit de tester la présence de bandes fluorescentes dans la fraction albumine, en utilisant une électrophorèse sur gel et une méthode spectrophotofluorométrique [18].

Le mode d'action cellulaire et moléculaire de l'ochratoxine A est peu connu. L'ochratoxine A inhibe le système enzymatique de la phosphorylase du foie, in vitro, et inhibe également la respiration de mitochondries isolées de foie de rat.

Quant au métabolisme de la toxine, de nombreux auteurs ont constaté que l'ochratoxine A injectée par voie intrapéritonéale chez le rat est partiellement métabolisée en acide isocoumarique (ou ochratoxine α) et en 4-hydroxyochratoxine A qui apparaît dans l'urine et les fécès avec l'ochratoxine A non modifiée. Ces deux composés sont peu toxiques pour le rat, le poulet, la truite... Mais seule l'ochratoxine A est retrouvée dans le sang, le foie et les reins.

GALTIER [31] a étudié in vitro la transformation de l'ochratoxine A par la flore microbienne animale. Il a constaté une hydrolyse de la toxine en ochratoxine α par le culot de centrifugation du contenu cæcal du rat contenant la flore microbienne, mais également par les liquides de rumen de vache et de mouton. Cette transformation pourrait protéger les ruminants contre l'ochratoxicose, alors que les monogastriques, particulièrement le porc, sont très sensibles à l'ochratoxine A [95].

2°- Patuline.



Patuline

a. La patuline est élaborée par un grand nombre de moisissures : Penicillium urticae, P. patulum, P. expansum, P. granulatum, P. lanosum, P. claviforme, P. melinii, P. divergens, P. cyclopium, P. griseofulvum, P. novea-zeelandiae, P. lapidosum, P. leucopus, P. equinum, Aspergillus clavatus, A. giganteus, A. terreus, Byssochlamys nivea et B. fulva (STOTT-BULLERMAN) [90].

b. Les substrats favorables à la production de patuline sont les fruits et les jus de fruits essentiellement, mais les souches patulinogènes sont également retrouvées dans les farines, le pain, les saucisses sèches [93] et les fourrages ensilés [20].

c. La patuline est avant tout une neurotoxine, mais elle provoque également des œdèmes pulmonaires avec hémorragies et cause des dommages aux capillaires du foie, de la rate et des reins [2].

Animal	Voie d'administration	DL_{50} (mg/kg)
Souris	Intra-péritonéale	15 - 30
Souris	Intra-veineuse	25
Souris	Sous-cutanée	15
Souris	Orale	35
Rat	Intra-veineuse	25 - 50
Rat	Sous-cutanée	15 - 25
Poulet	Orale	170

Tableau des valeurs de DL_{50} pour la patuline chez la souris, le rat et le poulet (d'après SCOTT) [85].

Pour l'embryon de poulet, la DL_{50} est de 2,35 µg [16].

La patuline a été utilisée chez l'homme en tant qu'antibiotique, mais elle causait des nausées, des irritations d'estomac après administration orale, et une application sur la peau provoque des œdèmes.

En injection intraveineuse, 100 mg de patuline sont tolérés ; la vaporisation d'une solution diluée, dans le nez, n'a pas d'effet nocif.
La patuline possède également un effet bactéricide, une activité antifungique et est toxique pour les végétaux supérieurs : la germination de la plupart des graines est inhibée pour des doses faibles, de 1 à 20 ppm.

L'activité biochimique de la toxine se traduit par une inhibition de la respiration aérobie dans de nombreux systèmes : bactéries, champignons, coupes de tissus. Il a été montré que l'inhibition est plus rapide dans le cas d'un extrait acellulaire ; la membrane constituerait donc une barrière à la pénétration de la patuline. L'inhibition de la respiration peut entraîner des modifications de la pénétration de divers substrats par exemple l'absorption de l'ion potassium par les érythrocytes.
De nombreuses enzymes sont détruites par la patuline : succinique-deshydrogénase, cytochrome-oxydase, aldolase ; cependant la concentration de patuline nécessaire est très élevée [2].

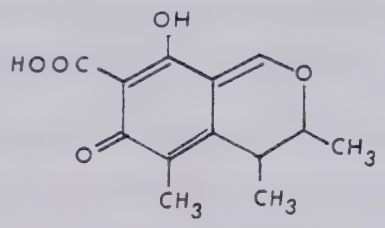
L'effet toxique est certainement dû à la réactivité de la patuline avec des groupements sulfhydriles tels que cystéine, glutathion, thioglycolate et dimercaptopropanol. Cependant, les enzymes sensibles ne possèdent pas toujours un groupement -SH dans leur site actif et, d'autre part, certaines enzymes, par exemple la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, possédant ce groupement, sont insensibles.

MOULE et HATEY [62] ont montré que la patuline inhibe l'activité de l'ARN polymérase - ADN dépendante A, responsable de la synthèse des ARN ribosomaux. L'inhibition se fait au niveau de l'initiation de la transcription. L'ARN-polymérase d'Escherichia coli est également sensible à la patuline.

La patuline est un inhibiteur compétitif de la lactate-deshydrogénase et non compétitif de l'alcool-deshydrogénase et de l'aldolase du muscle. L'analyse chimique d'aldolase du muscle inactivée, révèle une interaction covalente avec les groupes -SH et $-NH_2$ dans la protéine. La perte d'activité enzyma-

tique est liée à l'amplitude de la modification des groupes -SH et $-NH_2$ dans l'enzyme, par la patuline [18].

3°- Citrinine.



Citrinine

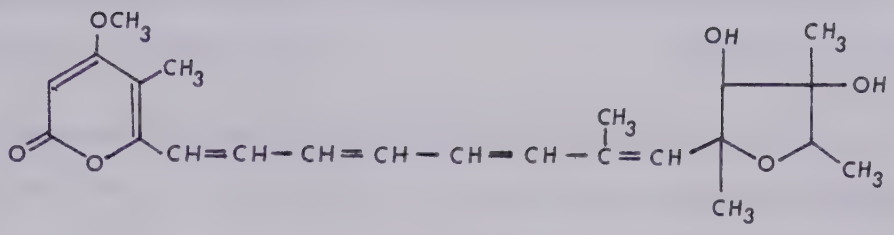
a. Moisissures productrices de citrinine : Penicillium fellutanum, P. lividum, P. implicatum, P. jenseni, P. citreo viride, P. notatum, P. expansum, P. viridicatum, Aspergillus terreus, A. niveus, A. candidus, Clavariopsis aquatica, Blennoria, Crotalaria crispata.

b. On les trouve essentiellement dans l'orge, le seigle, l'avoine, le froment, l'arachide et le riz.

c. Symptômes de l'intoxication [2, 85] :

- la citrinine inhibe la croissance et présente des effets tératogènes ;
- la citrinine a un effet biologique sur le foie et sur le rein :
  - . dégénérescence du foie chez les lapins recevant 20 mg de toxine par kilo de poids vif, pendant 8 semaines ;
  - . chez le cobaye et le lapin, la citrinine provoque des lésions rénales avec altération des fonctions glomérulaires, inhibition de la réabsorption d'eau et accroissement de l'excrétion urinaire ;
  - . chez la souris, le lapin et le chien, on observe une vasodilatation et une bronchoconstriction ;
- la citrinine possède également une activité antimicrobienne.

4° - Citréoviridine.



Citréoviridine

a. Elle est isolée de divers Penicillium : P. citreo-viride, P. toxicarum, P. ochrasalmoneum, P. fellutanum, P. pulvillorum, P. toxicarum.

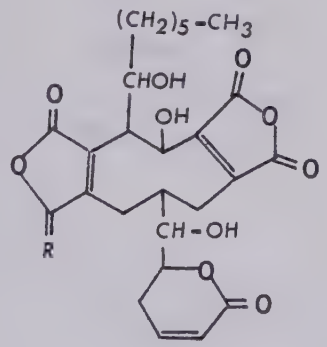
b. Cette toxine, très pigmentée, provoque le jaunissement du riz contaminé.

c. La citréoviridine est essentiellement une neurotoxine ; elle agit au niveau du système nerveux central et provoque une paralysie des membres ainsi que des convulsions. Il peut s'en suivre une mort par arrêt cardiaque ou arrêt respiratoire.

Dose létale$_{50}$ pour la souris mâle [85] :

- 7,2 mg de citréoviridine par kg, pour une injection intrapéritonéale ;
- 11 mg/kg, par voie sous-cutanée ;
- 29 mg/kg, par voie orale.

5° - Rubratoxines A et B.



R = O : rubratoxine B

R = H, OH : rubratoxine A

a. Elles ont été isolées d'Aspergillus flavus, Penicillium rubrium, P. purpurogenum.

b. On les retrouve essentiellement dans le sol et les matières organiques, mais également dans le blé, le riz, le maïs et autres céréales [60].

c. Signes cliniques de l'intoxication [2, 41] :

- diminution de la croissance ;
- nécrose des cellules hépatiques ;
- atteinte du rein ;
- anorexie suivie de déshydratation ;
- somnolence, diarrhées et ictère ;
- des malformations congénitales du fœtus peuvent être observées.

Des doses de rubratoxine B ont été administrées par voie intrapéritonéale à différentes espèces en vue de déterminer la dose létale [85] :

- DL50 souris = 3 à 6 mg/kg ;
- " rat = 0,36 mg/kg ;
- " chat = 0,20 mg/kg ;
- " chien = 3 mg/kg.

6° - Acide pénicillique.

Acide pénicillique

a. Cette mycotoxine est produite par un nombre important d'espèces de Penicillium et d'Aspergillus dont : Aspergillus ochraceus, A. sulphureus, A. melleus, A. sclerotiorum, A. alliaceus, A. ostianus ; Penicillium lividum, P. simplicissimum, P. cyclopium, P. thomii, P. roqueforti, P. mar-

tensii, P. fennelliae, P. aurentio-vireus, P. janthinellium, P. viridicatum, P. palitans, P. baarnense, P. puberulum.

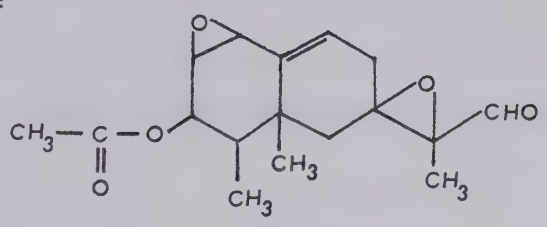
b. On le trouve dans les haricots secs, le maïs et autres céréales, ainsi que dans le tabac.

c. L'acide pénicillique est généralement moins toxique que la patuline ; il cause une nécrose des hépatocytes, des cellules rénales et de la thyroïde. Il possède également un caractère antibactérien, antifungique et antiviral.

Valeurs de la DL_{50} pour la souris [85] :

Mode d'administration	DL_{50} en mg/kg
Sous-cutanée	110
Intra-veineuse	250
Orale	600
Intra-péritonéale	70

7° - P. R. toxine.



P. R. toxine

Toxine de Penicillium roqueforti.

Les doses toxiques pour le rat sont les suivantes [85] :

- 11 mg/kg en cas d'injection intra-péritonéale ;
- 115 mg/kg par voie orale.

8°- Autres toxines [85] :

Toxine	Penicillium producteurs	Remarques
LUTEOSKYRINE	P. islandicum	Tumeurs du foie, nécrose centrolobulaire.
CYCLOCHLOROTINE	"	Cirrhose du foie, fibroses et tumeurs.
ISLANDITOXINE	"	DL_{50} de la souris = 3 mg/kg.
RUGULOSINE	P. islandicum et P. rugulosum	DL_{50} de la souris = 55 mg/kg.
ERYTHROSKYRINE	P. islandicum	DL_{50} de la souris = 60 mg/kg.
XANTHOCILLINE	P. notatum	DL_{50} de la souris = 25 à 40 mg/kg.
ACIDE CYCLOPIAZONIQUE	P. cyclopium A. versicolor	Neurotoxine DL_{50} du rat = 36 à 63 mg/kg
ACIDE SECALONIQUE	P. oxalicum Claviceps purpurea A. ochraceus	DL_{50} (souris) 42 mg/kg
GLIOTOXINE	P. terlikowskii P. cinerascens A. fumigatus A. terreus	DL_{50} (souris) 7 à 67 mg/kg selon la voie d'administration. lésions du rein.
HADACIDINE	P. frequentans	Irritation gastrointestinale.
VIRIDICATUMTOXINE	P. viridicatum	DL_{50} du rat = 122 mg/kg nécrose tubulaire rénale.
CITROMYCETINE	P. frequentans	

III. TOXINES TREMORGENIQUES

Toxine	Champignons producteurs
Penitrem A	Penicillium crustosum, P. granulatum
Penitrem B	P. cyclopium, P. palitans, P. martensii
Penitrem C	P. puberulum, P. olivino-viride
Verruculogène	P. verruculosum
Paxilline	P. paxilli
Fumitrémorgène A	Aspergillus fumigatus
Fumitrémorgène B	" "
Flavus trémorgène	Aspergillus flavus

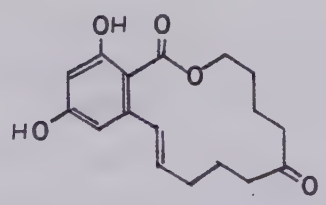
Le penitrem A provoque des affections rénales chez le rat, la souris, le poulet, le cheval, le mouton, la vache...

Chez le rat et la souris, la toxine a un effet diurétique avec une augmentation de l'excrétion des électrolytes et du glucose. Elle cause également une diminution du glycogène du foie.

Les bovins, les moutons, les chevaux atteints montrent une incoordination motrice, puis meurent par inanition.

IV. LES MYCOTOXINES DE FUSARIUM

1°- Zéaralénone.



Zéaralénone

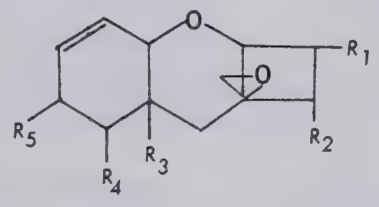
C'est une mycotoxine fluorescente dont l'absorption U.V. présente des maximums à 236, 274, 313 nm.

a. Synthétisée par Fusarium roseum, F.tricinctum, F.oxysporum, F.moniliforme.

b. On la trouve naturellement sur le maïs, le riz, le millet, le froment et l'orge.

c. La zéaralénone possède des effets œstrogènes et entraîne chez les bovins une diminution de la fertilité. Chez la jeune truie, elle provoque un gonflement des glandes mammaires et les avortements sont fréquents [58].

2°- Trichothécènes.



Toxine T_2

Ce sont des toxines produites par les espèces Fusarium, Trichoderma et Stachybotrys.

Le trichothécène T_2 provoque des troubles digestifs et des diarrhées sanglantes, ainsi que des hémorragies intestinales [2]. Elle produit une inflammation quand elle est appliquée sur la peau du lapin [102].

V. MYCOTOXINES DE STACHYBOTRYS

- La Stachybotryotoxine A.

Produite par l'espèce Stachybotrys.

Les stachybotryotoxicoses affectent l'Homme et le cheval. C'est un poison cardiaque qui provoque un arrêt du cœur en systole [58].

VI. MYCOTOXINES DE CLAVICEPS

- Ergotamine.

Composé alcaloïde de l'ergot produit par Claviceps purpurea.

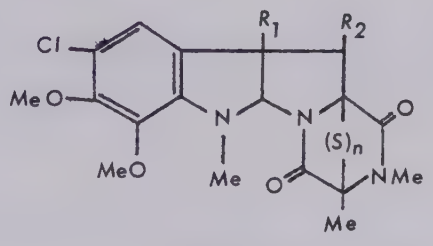
Sa toxicité se traduit par :

- une stimulation du système nerveux (convulsions, hallucinations) ;

- une stimulation des muscles lisses (paroi des artérioles) et une vasodilatation entraînant la mort des tissus périphériques et,par suite, une gangrène sèche des membres [55].

VII. LES SPORIDESMINES

- Sporidesmines.

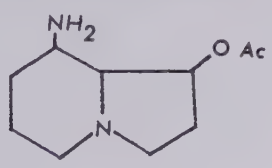


Sporidesmine A

Il existe huit sporidesmines ; elles sont produites par : Pithomyces chartarum. On les rencontre dans l'herbe des pâturages.

Elles provoquent chez le mouton des lésions du foie de type prolifération biliaire, accompagnée de fibrose et de nécrose des cellules du parenchyme [99]. Une photosensibilisation cutanée se manifeste vers le 10e jour.

VIII. SLAFRAMINE



Slaframine

Elle est élaborée par Rhizoctonia leguminicola qui se développe dans le trèfle rouge et d'autres plantes fourragères. D'après AUST, la slaframine pure est inactive ; une activation est nécessaire : elle peut être enzymatique (par les microsomes du foie) ou bien photochimique (pendant l'oxydation des flavines, telles que les riboflavines mononucléotides)[86].

CHAPITRE II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LES MOISISSURES ET LES MYCOTOXINES DANS LES DENREES D'ORIGINE ANIMALE CONSERVEES PAR SALAISON

-:-:-

I. Rôle des moisissures au cours de la maturation des viandes salées.

II. Facteurs influençant le développement des moisissures et la production de mycotoxines dans les viandes salées et séchées.

III. Comportement toxinogène des moisissures présentes à la surface des produits carnés conservés par salaison.

IV. Moyens de lutte contre l'envahissement du produit par des moisissures indésirables à la surface des salaisons.

I. RÔLE DES MOISISSURES AU COURS DE LA MATURATION DES VIANDES SALEES

La plupart des saucissons et des salamis crus et séchés ont une couche externe de moisissures caractéristiques, qui se développent normalement durant la maturation et le séchage du produit. Ces moisissures doivent trouver une source de nutriments convenables sur ce substrat et ont en commun une tolérance à une activité hydrique basse. Mais, l'action de ces moisissures sur les salaisons peut être aussi bien bénéfique qu'indésirable, voire toxique.

1° - Rôle favorable des moisissures [54, 72, 73].

La microflore constituant la "fleur" du saucisson fournit un arôme agréable et caractéristique au produit. La flaveur désirable peut être produite par les moisissures protéolytiques et lipolytiques xérotolérantes, qui croissent sur les saucissons ou les jambons de campagne.

Les chercheurs hongrois pensent que les moisissures sont importantes pour la maturation du salami hongrois. Les saucissons recouverts de moisissures sèchent plus uniformément et plus lentement. Cela conduit à une amélioration de la qualité et à une réduction de la perte de poids, de 7 %.

D'autre part, cette couche de moisissures permet la conservation des produits et leur confère un aspect particulier. Un exemple nous est fourni dans le cas des jambons de campagne : le gras situé à la périphérie des jambons couverts de moisissures ne s'oxyde que très légèrement, même après une période de séchage de 9 à 12 mois, alors que l'on observe un fort rancissement du gras des jambons dépourvus de moisissures.

2° - Altérations des produits par les moisissures indésirables.

Une contamination du produit par des moisissures peut parfois entraîner des défauts d'aspect et des modifications chimiques. En effet, le champignon prélève les éléments nécessaires à l'édification de son contenu cellulaire et à la production de l'énergie que réclament ses phénomènes vitaux. La transformation est réalisée par de puissants systèmes enzymatiques.

Contrairement aux vitamines et aux acides aminés qui entrent sans transformation dans la cellule fongique, la cellulose, l'amidon et les protéines de haut poids moléculaire sont clivées par des hydrolases. Egalement, de nombreuses réactions d'oxydation et de réduction font intervenir des oxydases-deshydrogénases et des desmolases.

Les sources de carbone dont dispose le champignon sont les glucides, les acides aminés, les acides organiques, les composés polycycliques, les alcaloïdes etc.... L'azote nécessaire à la synthèse de ses acides aminés et de ses protéines provient à la fois de l'azote nitrique, de l'azote ammoniacal et de l'azote organique. La moisissure prélève également les oligoéléments tels que le soufre, le phosphore, le potassium, le magnésium....

Tout cela entraîne une modification de la valeur nutritionnelle et des caractères organoleptiques des denrées. Des difficultés de conservation du produit peuvent également en résulter. Mais le problème se situe aussi au niveau des maladies professionnelles et des intoxications des consommateurs dues à la présence de souches toxinogènes.

Ces constatations d'ordre général nous mènent à une étude plus spécifique, visant à cerner les conditions favorisant le développement et surtout la production de substances toxiques par certaines moisissures.

II. FACTEURS INFLUENCANT LE DEVELOPPEMENT DES MOISISSURES ET LA PRODUCTION DES MYCOTOXINES DANS LES VIANDES SALEES

En tout premier lieu, il faut considérer l'état de la souche et son potentiel génétique pour la production de toxines, mais les caractéristiques du milieu contaminé, telles que la température, l'humidité, la durée de culture, la nature et la composition du substrat ainsi que la composition gazeuse de l'atmosphère, doivent répondre à certains critères pour permettre éventuellement l'élaboration de mycotoxines.

1°- La souche.

Parmi les souches appartenant à une espèce réputée toxinogène, toutes ne sont pas forcément capables d'élaborer des mycotoxines dans le substrat contaminé. Par exemple, 60 % des souches d'Aspergillus flavus isolées produisent l'aflatoxine et, sur 120 souches de Penicillium expansum cultivées sur milieu Czapek, 17 seulement permettent la mise en évidence de patuline [1].

2°- Influence de la température.

Pour se développer, les moisissures doivent rencontrer une température favorable : l'intervalle de 15 à 30°C convient à la plupart d'entre elles. La vitesse de croissance augmente avec la température jusqu'à un optimum se situant à 20 - 25°C ; au-delà, la vitesse de croissance diminue généralement rapidement. MOREAU [60] a établi une classification en fonction des températures qui conviennent au développement du champignon :

- les champignons thermophiles se développent à des températures comprises entre 20 et 50°C ;
- les champignons mésophiles se développent entre 10 et 40°C avec un optimum de croissance à 25°C. Penicillium chrysogenum et Aspergillus versicolor appartiennent à cette classe ;
- les champignons psychrophiles voient leur optimum de croissance à 5 - 10°C ;
- les champignons cryophiles possèdent une température optimale inférieure à 5°C.

Cependant, ce n'est pas toujours la température optimale de croissance qui correspond le mieux à la production de tous les métabolites, notamment des toxines. Ainsi MARTH [56] a réalisé des essais avec une souche d'Aspergillus flavus : la croissance peut se réaliser entre 7 et 45°C alors que la production d'aflatoxine n'a lieu qu'entre 12 et 41,5°C.

Quelques exemples illustrent les différences entre les températures convenant à l'élaboration de certaines mycotoxines :

- SCHINDLER [77] constate que 25 souches d'Aspergillus flavus et d'A. parasiticus ne produisent pas d'aflatoxine lorsqu'elles sont cultivées à des températures inférieures à 7, 5°C ou supérieures à 40°C, alors que des contrôles réalisés à 22°C permettent l'obtention de 0, 19 à 930 µg d'aflatoxine pour 50 ml de milieu de culture ;

- ensemencé sur le riz, le pain ou le maïs, Aspergillus ochraceus produit une maximum d'ochratoxine à 28°C. A des températures de l'ordre de 15° et 35°C, on retrouve encore la toxine, mais à 4°C, les taux décelés sont très faibles (TRENK) [96] ;

- CIEGLER [13] utilise des souches d'Aspergillus ochraceus produisant à la fois l'ochratoxine A et la citrinine. Pour une température d'incubation de 28°C, il retrouve essentiellement l'ochratoxine A, alors qu'à 10 - 20°C, c'est la citrinine qui apparaît dans le substrat.

3°- Rôle de l'humidité et de l'activité hydrique du substrat.

a. Définitions.

. Humidité relative du substrat (MOREAU) [60] :

Pour une température donnée, à chaque teneur en eau du substrat correspond une certaine humidité relative représentant l'état de liberté de l'eau dans le substrat. Pour de faibles humidités relatives (jusqu'à 25 à 30 %), l'eau est fixée au substrat par des énergies de liaison importantes.

. Activité hydrique du substrat (NORTHOLT et coll.) [64]
= a_w

$$a_w = \frac{\text{pression de la vapeur d'eau dans le substrat}}{\text{pression de la vapeur d'eau pure}}$$

pour une même température.

A faible activité hydrique, l'eau est liée par les sucres, les sels, les protéines et les autres solutés. La croissance des micro-organismes ne peut pas se produire tant que l'eau ne se présente pas sous une forme utilisable.

b. Classification des moisissures, d'après MOREAU [60], en ce qui concerne leur développement en fonction de l'humidité relative.

Classification	% humidité relative nécessaire à la germination spores	% humidité relative nécessaire à la croissance	Exemples
XEROPHILES	<80 %	<90 %	A. repens A. restrictus A. versicolor
MESOPHILES	80 - 90 %	95 - 100 %	Cladosporium cladosporoides Penicillium cyclopium
HYGROPHILES	>90 %	100 %	Mucor circinelloïdes Epicoccum nigrum

c. Observations tirées de travaux réalisés sur des espèces de de moisissures toxinogènes.

Il s'est révélé que 80 à 90 % d'humidité relative sont nécessaires au développement d'Aspergillus flavus.

Pour des conditions de température et de substrat données, SCHINDLER et NEISHEIM [78] déterminent que l'Aspergillus ochraceus produit un maximum d'ochratoxine A, lorsque la quantité d'eau se situe entre 40 et 70ml par 100 grammes de blé moulu.

De plus, HARWIG et CHEN [40] ont ensemencé Penicillium viridicatum sur le blé et retrouvent une quantité importante d'ochratoxine A.

En ce qui concerne les jambons de campagne, LEISTNER et AYRES [53] constatent que le taux de croissance des moisissures à la surface des jambons varie considérablement selon l'humidité relative à laquelle ils sont maintenus pendant la période de maturation : les jambons enveloppés dans du papier voient leur surface se recouvrir d'un nombre important de colonies de moisissures, alors que sur ceux qui ne sont pas enveloppés et maintenus à un taux d'humidité assez bas (65 %), les champignons se développent mal.

MARTH [56] conclut que l'insuffisance d'humidité pour le développement des moisissures peut être utilisée à titre préventif contre l'élaboration des mycotoxines.

Température et humidité sont des paramètres très liés et très actifs pour réduire la production de toxine dans les conditions d'un salami mûr (où la température est de 13°C et l'activité hydrique de 0,93). Mais, si l'on élève la température à 20°C ou bien l'activité hydrique à 0,97, on constate que le nombre de souches productrices de mycotoxines augmente.

4°- La durée de la culture.

Elle est en relation étroite avec la température et l'activité hydrique du substrat. La vitesse de production de mycotoxines est plus rapide lorsque la culture est réalisée à la température optimale, soit 28°C pour l'aflatoxine. Une étude sur la production d'ochratoxines dans les céréales conduit TRENK [96] aux résultats suivants :

- à 28°C, la production atteint 1,5 à 18 mg d'ochratoxine par gramme de substrat, après 7 à 14 jours d'incubation ;
- à 15°C, on retrouve 30 à 60 microgrammes de toxine par gramme de céréale dans un délai de 15 jours ;
- mais, lorsque la culture est réalisée à 4°C pendant 28 jours, le taux de toxine ne dépasse pas 100 µg/kg.

5°- La nature du substrat (facteurs nutritionnels).

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, en général peu exigeants ; leur croissance peut se faire aux dépens de sels minéraux et d'une substance organique jouant le rôle de source de carbone et d'énergie. La nature chimique du substrat permettra ou non la croissance d'une espèce fongique, selon que celle-ci sera ou non pourvue du bagage enzymatique nécessaire à l'utilisation du substrat.

Ainsi les substrats riches en carbohydrates (surtout glucose et saccharose) contiennent davantage d'aflatoxine que les produits huileux ou riches

en protéines.

Quant aux ions minéraux, LAI et coll. [51] ont montré que Fe^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, B^{3+} et Mo^{6+} sont nécessaires au développement d'Aspergillus melleus et d'A. ochraceus et à la production d'ochratoxine par ces souches. Ils concluent, par ailleurs, que la composition du milieu affecte davantage la synthèse de toxine que la croissance mycélienne.

De plus, sur 453 souches d'A. ochraceus testées, YAMASAKI et coll. [103] constatent que le taux d'ochratoxine A est plus élevé lorsque la solution nutritive contient 1 % de phénylalanine et 2 % d'extrait de levure.

Ces constatations ont une importance majeure, lorsqu'il s'agit de produire la mycotoxine sur un milieu de culture liquide ; cependant, dans le cas des viandes salées et séchées, la nature du substrat varie peu. On peut toutefois différencier un produit frais d'un produit maturé ou bien altéré. De plus, LEISTNER et AYRES [53] considèrent que le taux de croissance, à la surface des saucissons, dépendrait du type de produit ; ainsi, les échantillons de type salami hongrois ou salami italien montraient une croissance importante, alors que les saucissons provenant d'Espagne et d'Allemagne étaient moins propices à un développement mycélien.

6° - L'aération et la composition de l'atmosphère.

La majorité des moisissures sont aérobies. Des expériences ont été réalisées avec des souches productrices d'aflatoxines, en faisant varier la composition de l'air ambiant : on obtient un ralentissement ou même une inhibition de la toxinogenèse, lorsque l'on diminue la quantité d'oxygène de 5 à 1 % (le taux normal d'oxygène est de 20 %) ; des résultats analogues sont obtenus par adjonction de CO_2 (valeurs de CO_2 supérieures à 20 %, alors que le taux normal se situe à 0,03 %), ou par augmentation de la teneur en azote.

Parmi les espèces susceptibles de croître en anaérobiose stricte, notons : Byssoclamis niger, Aspergillus clavatus et différents Fusarium [52].

7°- Le pH du milieu.

Un pH compris entre 4 et 8 convient généralement au développement des moisissures.

8°- Les interactions entre espèces présentes sur un même substrat.

Les moisissures toxiques apparaissent rarement comme une culture pure sur les aliments naturels : il y a donc coexistence avec d'autres moisissures, avec des levures ou des bactéries, qui peut se traduire par :

- une simple compétition pour l'envahissement du substrat ;
- une production d'antibiotiques par l'un des antagonistes ;
- une transformation du substrat par l'un des champignons;

le milieu deviendra alors défavorable pour les espèces concurrentes.

La présence des autres organismes influence l'activité toxinogène, mais l'inverse peut également se produire : la toxine peut affecter les microorganismes présents dans l'environnement immédiat. Ainsi, la croissance de quelques microorganismes peut être inhibée par l'aflatoxine ; par contre, Flavobacterium aurantiacum fait disparaître la toxine irréversiblement d'une solution nutritive ou d'un aliment. De même, la coexistence d'un Aspergillus flavus avec A. niger, Rhizoctania solani ou des Penicillium, entraîne une diminution de la production d'aflatoxines [56].

De plus, à la suite de travaux sur la toxinogenèse d'un mélange de souches inoculées sur le salami hongrois, INCZE et FRANK [44, 45] constatent que : - en aucun cas, une souche non toxinogène ne stimule une souche toxinogène ;

- si un mélange de souches productrices de toxine est cultivé sur un milieu Czapek nutritif, la production de mycotoxines n'est pas modifiée ;
- la toxinogenèse de souches toxinogènes mêlées à des souches non toxinogènes n'est pas inhibée, dans les conditions optimales de culture.

x x

x

Connaissant les conditions nécessaires au développement des moisissures ainsi qu'à l'élaboration de toxines par certaines d'entre elles, nous allons considérer les souches présentes sur le saucisson afin de déterminer si, dans certaines conditions favorisantes, elles sont susceptibles d'être toxinogènes.

III. COMPORTEMENT TOXINOGENE DES MOISISSURES PRESENTES A LA SURFACE DES PRODUITS CARNES CONSERVES PAR SALAISON

L'existence de moisissures, à la surface des salaisons, a suscité l'intérêt des chercheurs spécialisés dans les problèmes que soulève la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires.

L'identification des espèces de moisissures présentes sur ces denrées permet de suspecter le pouvoir toxinogène de certaines d'entre elles et de le tester sur des milieux de culture particuliers et dans des conditions favorisantes. Les souches reconnues toxinogènes pourront alors être ensemencées en culture pure sur des viandes salées et séchées, et leur "écologie" sera étudiée.

A. Identification des moisissures isolées des produits de charcuterie.

1°- Classification en genres.

Les travaux réalisés par HADLOCK [35], FIEDLER [23] et SUTIC [91] permettent de classer les moisissures présentes à la surface des produits conservés par salaison, dans les genres suivants : Penicillium, Aspergillus, Scopulariopsis, Paecilomyces, Trichothecium, Geotrichum, Cladosporum, Sporendonema, Mucor, Alternaria, Cephalosporum, Fusarium...

Les genres les plus représentés sont, comme nous l'indiquent les deux tableaux suivants : les Penicillium, les Aspergillus et les Scopulariopsis.

a. Répartition des souches isolées, dans leur groupe correspondant :

Substrat	Nombre de souches isolées	Répartition des souches en %			Référence
		Penicillium	Aspergillus	Autres	
Salami - saucisson sec - lard - saucisson à cuire - jambon sec - viande de bœuf séchée.	195	63,0 %	24,0 %	Scopulariopsis 3,5% Alternaria 1 % Cladosporum 2,5 %	FIEDLER [23]
Viande et produits carnés provenant d'Allemagne	255	56,0 %	33,7 %	9,8 %	HADLOCK [35]
Jambon de campagne	562	71,7 %	21,5 %	6,4 %	SUTIC [91]

b. Les 120 souches isolées de 44 saucissons secs par MINTZLAFF et coll. [57] appartiennent à :

- 10 groupes de Penicillium ;
- 1 groupe du genre Aspergillus ;
- 1 groupe du genre Scopulariopsis.

c. LEISTNER et AYRES [53] déterminent le pourcentage d'échantillons qui sont contaminés par les genres de moisissures les plus représentés :

Moisissures considérées	% de jambons contaminés	% de saucissons contaminés
Penicillium	83 %	89 %
Aspergillus	90 %	33 %
Scopulariopsis	8 %	41 %

On a constaté que, dans le cas du saucisson, le genre Penicillium prédomine pendant toute la maturation. Les Aspergillus se développent seulement s'il y a peu ou pas de croissance de Penicillium. En outre, les Scopulariopsis prolifèrent sur les produits suffisamment secs.

Sur les jambons, les Penicillium prédominent au début de la maturation, puis les Aspergillus leur succèdent lorsque l'activité hydrique est assez basse et atteint un taux plus favorable aux Aspergillus qu'aux Penicillium. Outre la diminution d'activité hydrique, une augmentation de température qui est appliquée après 3 à 4 mois de maturation peut favoriser les Aspergillus.

La différence observée entre le saucisson et le jambon est probablement due à l'activité hydrique du substrat.

2°- Classification des moisissures appartenant au genre Penicillium.

a. Mise en évidence des moisissures appartenant au genre Penicillium (MISLIVEC)[59]

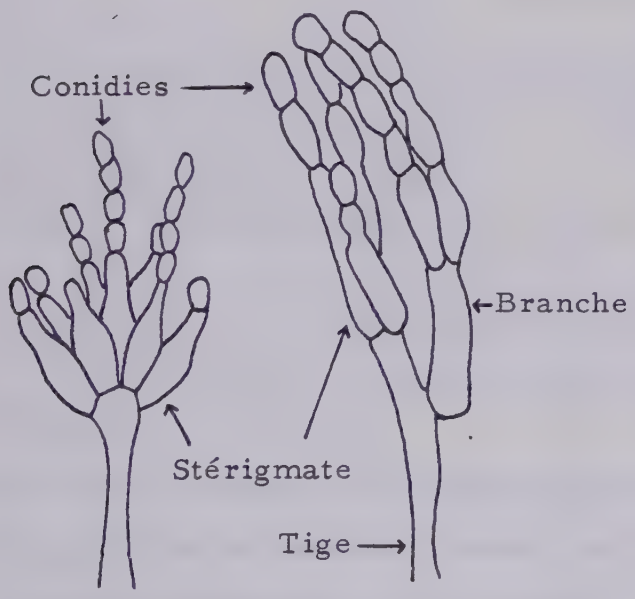
Différents milieux de culture sont utilisés : une solution de Czapek

gélosé, un milieu malt gélosé ou bien un milieu Czapek contenant du Botran. Les températures d'incubation varient de 21 à 28°C. Quant à la durée d'incubation, elle sera de 10 à 14 jours pour une observation macroscopique et de 5 à 7 jours pour une observation microscopique, lorsqu'apparaît la sporulation.

Observations.

- Caractéristiques macroscopiques : il s'agit de la texture de la surface de la colonie (qui peut être lisse, laineuse ou rugueuse) de la couleur, de l'aspect de l'exsudat (coloré ou non), de l'odeur et de la vitesse de croissance des colonies.

- Caractéristiques microscopiques : elles concernent l'observation de la morphologie du conidiophore (type de cellules qui constituent la tête du conidiophore, arrangement de ces cellules, symétrie ou asymétrie de la tête du conidiophore).



Pénicillium

Le conidiophore est la structure sur laquelle les spores asexuées (ou conidies) des espèces Penicillium sont produites. Il se développe à partir du mycélium végétatif et consiste en une tige (20 - 150 µm) et une tête produite au sommet et composée de un à trois types de cellules, dont les stérigmates qui produisent les conidies (3 à plus de 6 µm de diamètre). Les conidies peuvent être sphériques ou elliptiques, avec des parois lisses ou des parois rugueuses ; elles sont souvent produites en chaînes adhérentes.

b. Détermination des groupes de Penicillium les plus représentés sur les produits carnés salés et séchés.

. Pourcentage des produits contaminés par des souches de Penicillium:

LEISTNER [53] estime que la majorité des Penicillium appartiennent aux séries : P. expansum, P. janthinellum, P. chrysogenum.

Série	% des jambons contaminés	% des saucissons contaminés
P. expansum	60 %	40 %
P. janthinellum	-	70 %
P. chrysogenum	30 %	19 %

Remarque : P. janthinellum n'est pas détecté sur le jambon car l'activité hydrique de ce dernier est trop faible pour ce champignon.

. Pourcentage des souches isolées appartenant à tel ou tel genre de Penicillium : HADLOK et coll. [35] retrouvent des Penicillium sur 171 des 207 produits étudiés (soit 82,8 %).

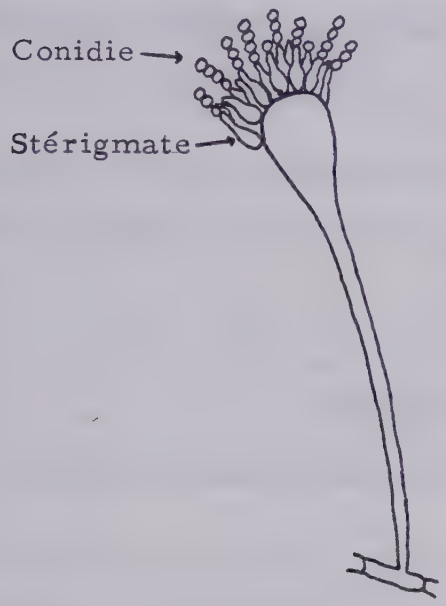
Série	% de souches isolées du saucisson	% de souches isolées du jambon	% de souches identifiées par FIEDLER [23]
P. viridicatum	27 %	40 %	2/123
P. cyclopium	20 %	35 %	43/123
P. chrysogenum	23 %	11 %	40/123

. De nombreux autres groupes de Penicillium sont également rencontrés sur les salaisons, mais avec une fréquence moindre. On peut citer : P. granulatum, P. viridicatum, P. frequentans, P. roqueforti, P. commune, P. variable, P. puberulum, P. citrinum, P. brevi compactum, P. camemberti, P. urticae, P. melinii... P. miczynskii [7, 53, 88].

3°- Classification des moisissures appartenant au genre Aspergillus.

a. Identification des Aspergillus.

Elle est réalisée sur Czapek gélosé ou sur malt gélosé. Ses caractéristiques ont été résumées par TUITE [97]. Le genre Aspergillus est caractérisé par une tête conidienne au niveau de laquelle les conidies sont produites en chaîne, à partir des stérigmates développés sur l'apex gonflé d'une tige (conidiophore). Les cellules productrices de conidies peuvent être disposées sur 1 ou 2 rangs, ce qui permet de distinguer deux formes : les unisériés et les bisériés.



Aspergillus

Exemples de caractères aidant à la classification :

- A. niger possède une tête conidienne de couleur noire ;
- A. ochraceus présente des têtes jaune ocre ;
- Les Aspergillus appartenant au groupe A. glaucus et A. restrictus sont xérophytiques et demandent 20 à 40 % de glucose, alors que le milieu Czapek habituel en contient seulement 3 %.

b. Détermination des groupes d'Aspergillus les plus représentés sur les produits carnés salés et maturés.

SUTIC [91] a réalisé une étude sur 356 jambons de campagne maturés de 1 à 12 mois :

- le groupe A. glaucus prédomine et représente 36 % des souches isolées ; on retrouve A. repens (21 fois), A. amstelodami (18 fois), A. pseudoglaucus (3 fois) et A. ruber (2 fois) ;
- en second lieu, se trouve le groupe A. versicolor avec 28 % des souches isolées, parmi lesquels A. versicolor (21 fois) et A. sydowi (13 fois) ;
- le groupe des A. restrictus représente encore 25 % des Aspergillus identifiés, dont 17 A. restrictus et 7 A. penicilloïdes...

Ces résultats sont appuyés par ceux de LEISTNER [53], HADLOK [35] et FIEDLER [23] qui confirment le fait que le groupe A. glaucus est prédominant. Ils retrouvent A. ruber et A. amstelodami sur les jambons dont l'activité hydrique est assez basse pour être favorable au développement des Aspergillus. Par contre, ils les rencontrent dans le saucisson, seulement si les Penicillium n'interfèrent pas dans leur croissance. Pour FIEDLER, A. repens représente 60 % des Aspergillus isolés et A. ruber 11 %.

Certains autres groupes sont peu représentés : A. ochraceus , A. flavus, A. candidus, A. fumigatus, A. nidulans.

Après cette revue nous indiquant les moisissures qui sont présentes sur les salaisons, l'intérêt consistera à vérifier si certaines des souches répertoriées possèdent un potentiel toxinogène.

B. Mise en évidence du pouvoir toxinogène des souches.

1°- Culture sur un milieu synthétique favorable à l'élaboration de toxines puis extraction et identification.

Les milieux les plus souvent utilisés pour les cultures de souches sont les suivants : Czapek, extrait de levure auquel on ajoute du glucose, du malt ou de l'extrait de pomme de terre gélosé et sucré. Pour la mise en évidence des toxines fluorescentes, telles que les aflatoxines, les ochratoxines, zéaralénone.., un premier contrôle peut être réalisé en examinant les cultures sous lumière ultraviolette. Mais, pour une meilleure précision, les toxines sont extraites du milieu par un solvant et, après purification de l'extrait, elles sont séparées par chromatographie en couche mince. Des standards déposés sur le chromatogramme permettront leur identification. Les toxines fluorescentes seront visibles sous lumière ultraviolette, les autres seront révélées par pulvérisation de substances spécifiques sur le chromatogramme.

2°- Test de l'embryon de poulet.

Ce test permet de discerner rapidement les souches productrices de substances toxiques et donc d'écarter les souches non toxinogènes qui ne présentent ici aucun intérêt.

WU et AYRES [101] ont testé la toxicité de souches d'Aspergillus et de Penicillium, isolées de viandes séchées et salées, puis cultivées sur un milieu constitué d'extrait de levure et de glucose (20 %). Après incubation à 27°C pendant 3 semaines, la toxine est extraite par du chloroforme puis l'extrait est introduit dans la chambre à air d'un œuf de poule embryonné.

Espèces	Proportion de souches toxiques pour l'embryon
P. expansum	2/15
P. notatum	1/3
P. brevi compactum	1/2
A. ruber	2/22
A. sydowi	2/12
A. restrictus	1/12
A. amstelodami	2/7
A. chevalieri	1/2
A. fumigatus	1
A. repens	5/28

On constate que parmi les souches appartenant à des espèces réputées toxinogènes, certaines ne possèdent pas le potentiel génétique nécessaire à la production de toxine.

L'identification des substances chimiques responsables de la mort des embryons de poulet sera réalisée après extraction du produit toxique à partir du milieu de culture et comparaison avec des standards purs.

3°- Résultats.

a. Principales mycotoxines isolées de cultures de Penicillium.

CIEGLER [14] et FIEDLER [23] ont isolé environ 400 souches de Penicillium à partir de produits carnés et, après ensemencement sur YES (extrait de levure auquel 20 % de glucose sont ajoutés), ils recherchent les différentes toxines. Les résultats obtenus par ces deux auteurs sont résumés dans le tableau suivant :

Toxine	Nombre de souches productrices et pourcentages correspondants	
	CIEGLER	FIEDLER
Acide pénicillique	44 (50 %)	59 (43 %)
Ochratoxine A	17 (19,3 %)	44 (32,5 %)
Trémortine	11 (12,5 %)	
Citrinine	10 (11,3 %)	14 (10,3 %)
Patuline	6 (6,8 %)	18 (13,3 %)
Total.....	88	135

b. Mise en évidence des toxines produites par des souches identifiées de Penicillium.

CIEGLER, MINTZLAFF et coll. [14] ont identifié 146 espèces isolées du saucisson cru. Les souches ont été ensemencées sur milieu YES puis 9 toxines ont été recherchées. 5 mycotoxines ont été retrouvées : la citrinine, l'ochratoxine A, la trémortine, l'acide pénicillique, la patuline.

Espèce	Toxines produites	Proportion de souches productrices
P. citrinum	Citrinine	1/11
P. claviforme	Citrinine	1/1
P. commune	Ochratoxine A, ac. pénicillique, Trémortine	5/5
P. cyclopium	Ochratoxine A, ac. pénicillique,	4/7
P. expansum	Ac. pénicillique, patuline, citrinine	14/41
P. frequentans	Trémortine, ochratoxine A	2/5
P. panthenellum	Ac. pénicillique	5/27
P. viridicatum	Trémortine, ochratoxine A, ac. pénicillique	30/39
P. purpurogenum	Ochratoxine A	2/2

ALPERDEN et MINTZLAFF [1] retrouvent la patuline dans 12/120 souches de P. expansum ensemencées sur Czapek.

c. Mise en évidence des toxines produites par le genre Aspergillus.

Les résultats des travaux sont colligés dans le tableau ci-dessous :

Source des Aspergillus	Espèces	Toxines produites	Références
Jambon Saucisson	A. flavus	Aflatoxine	SUTIC [91] STREZELECKI [88] BULLERMAN [7]
Jambon Saucisson et lard	5 A. flavus 1 A. parasiticus 1 A. ochraceus	Aflatoxine Aflatoxine Ochratoxine A et ac. penicillique	FIEDLER [23]
Saucisson	2 A. versicolor	Stérigmatocystine	INCZE [44, 45]
	10/16 A. versicolor	Stérigmatocystine	HALLS-AYRES [39]

Ces souches toxinogènes répertoriées et obtenues en culture pure pourront alors être ensemencées sur le saucisson ou le jambon de campagne. Elles seront utilisées pour tester leur aptitude à se développer à la surface du produit mais surtout pour vérifier la production éventuelle de substances toxiques qui rendraient la denrée dangereuse à la consommation.

C. Ensemencement sur saucisson et sur jambon de campagne, des souches reconnues toxinogènes et recherche des mycotoxines.

Une telle étude peut être justifiée par le fait que JACQUET et TEHERANI [46] ont pu mettre en évidence de l'aflatoxine sur des saucissons du commerce qui avaient séjourné en milieu trop humide (dû à une surcharge du hâloir) et sur lesquels s'étaient développées des moisissures bleuâtres, anormales. Après détermination des souches présentes, de nombreux Penicillium ont été répertoriés, mais également des Aspergillus dont A. glaucus en forte proportion et des souches d'A. flavus. Donc, une recherche d'aflatoxines dans ces échantillons fortement contaminés s'imposait. Sur 25 saucissons suspects, 6 ont révélé la présence d'aflatoxines à des concentrations de 39 à 420 µg/kg.

1°- Echantillons contaminés puis soumis à des conditions normales d'étuvage et de maturation (les toxines ne sont pas retrouvées).

A partir de souches de Penicillium isolées du saucisson et productrices d'acide pénicillique, d'ochratoxine, de trémortine, de citrinine et de patuline sur milieu synthétique, CIEGLER et coll. [15] ensemencent des saucissons de 200 grammes.

L'étuvage et la maturation de ces produits se déroulent comme suit :

Durée	Température	% Humidité
40 heures	22° C	95 %
24 heures	20° C	90 %
18 heures	18° C	85 %
≃ 70 jours	14° C	70 - 75 %

Dès le 5e jour, un enduit important et uniforme de moisissures s'étend à la surface des saucissons. La recherche des mycotoxines est réalisée après 2, 4 ou 10 semaines, mais on n'en retrouve aucune.
CIEGLER en conclut que le saucisson est un substrat qui ne convient pas à l'élaboration de toxine par les moisissures qui, pourtant, se sont bien développées.

2°- Recherche des conditions propices à l'élaboration de toxines.

Toutefois, de nombreuses investigations ont été réalisées en vue de retrouver des mycotoxines sur des viandes séchées et salées, après inoculation par des spores appartenant à des espèces toxinogènes, et ont abouti à des résultats positifs. C'est en contrôlant les paramètres tels que la température, l'humidité relative et la durée de maturation, que l'on peut déterminer si, dans les conditions normales de séchage, des risques de toxinogenèse peuvent éventuellement apparaître, ou bien si des conditions favorisantes sont nécessaires à l'élaboration de la substance toxique.

a. Ensemencement par des spores de souches productrices d'aflatoxines.

Des recherches relatives à la production d'aflatoxine dans les viandes ensemencées par Aspergillus flavus et A. parasiticus ont été entreprises par BULLERMAN et coll. [8, 9] et par TAUCHMAN [92]. Ils testent la production de toxines en fonction de la température et de l'hygrométrie de l'ambiance dans laquelle s'est effectuée la maturation du produit.

. Pour les viandes fraîches et le jambon frais [8], la température correspondant à un maximum de production d'aflatoxines se situe aux environs de 20°C. A 15°C, la toxine est retrouvée à l'état de traces et à 10°C on ne décèle rien. Pour les échantillons placés à 30°C, de nombreuses bactéries et moisissures se développent et interfèrent avec A. flavus de sorte que la toxine n'est pas produite.

. Des jambons de campagne salés et maturés pendant 3, 6, 9 ou 12 mois sont inoculés avec une suspension de spores d'A. flavus et

A. parasiticus. L'aflatoxine est retrouvée sur les jambons de 6 à 9 mois, lorsque la température est proche de 30°C. Par contre, des jambons de 12 mois sont trop secs pour permettre un développement mycélien [9].

. Dans le cas du saucisson, BULLERMAN [8] situe la température optimale pour la production d'aflatoxine à 20°C, si toutefois l'hygrométrie est supérieure à 75 %. Il en déduit qu'une température inférieure à 15°C, accompagnée d'une humidité ne dépassant pas 75 %, préviendrait le développement d'A. flavus et A. parasiticus durant la maturation. TAUCHMAN [92] réalise ses essais sur le saucisson à 2 températures différentes et ses résultats sont les suivants :

Température ° C	Durée de culture (jours)	Production d'aflatoxines	
		par A. flavus (en ppb)	par A. parasiticus (en ppb)
25°	30 j.	17 070	912 000
15°	25 j.	17	342

Production d'aflatoxines dans le saucisson

Autres résultats réunis par BURMEISTER et LEISTNER [11].

Nature du produit contaminé	Quantité d'aflatoxine retrouvée		Référence
	Aflatoxine B 1	Aflatoxine G 1	
Lard fumé et saucisson cru	300 ppb	400 ppb	FRANK (1966)
Viande bœuf cuite	11 000 ppb		WILDMAN (1967)
Cervelas Jambon Lard	5 10 1 000 à 5 000		HANSEN (1969)
Produits carnés	26 000	18 000	BURMEISTER (1969)

Production d'aflatoxines B 1 et G1 dans différents produits carnés.

Donc, saucissons et jambons conviennent fort bien au développement des moisissures productrices d'aflatoxines et de surcroît à l'élaboration de toxines si toutefois les conditions de température et d'hygrométrie le permettent.

b. Résultats relatifs à la production d'ochratoxine A sur les jambons.

ESCHER et coll. [19] ont réalisé une étude concernant la production d'ochratoxine A sur le jambon de campagne, ensemencé par deux souches d'Aspergillus ochraceus toxinogènes. Ils retrouvent 7 900 ppb de toxine, lorsque les jambons sont maturés entre 25° et 30°C. Des températures de 5°, 15° ou même 37°C, ne conviennent pas au champignon.

c. Travaux réalisés avec des souches productrices de citrinine.

L'aptitude des souches de Penicillium viridicatum à produire de la citrinine sur les jambons de campagne, a été envisagée par WU et coll. [100]. Une maturation à 25-30°C s'accompagne d'une production optimale de 600 µg de toxine pour des échantillons de 30 grammes. Par contre, pour des températures de l'ordre de 10 à 15°C, on note peu de développement mycélien et la toxine n'est pas retrouvée.

d. Toxinogenèse de Penicillium expansum ensemencé sur des saucissons.

ALPERDEN et coll. [1] ont inoculé des souches de P. expansum toxinogènes sur des saucissons fraîchement embossés. La maturation des produits est réalisée comme suit :

Température	Hygrométrie	Durée
24°	95 %	48 heures
20°	90 %	24 "
18°	85 %	12 "
15°	75 %	30 jours

La patuline est mise en évidence seulement entre le 10 et le 18e jour.

e. Toxinogenèse de souches d'Aspergillus versicolor ensemencées sur des jambons.

La production de stérigmatocystine par des souches d'A. versicolor est étudiée par HALLS et AYRES [39] : après 14 jours à 20 ou 28°C, 10 à 20 µg de toxine sont formés par tranches de 25 grammes (400-800 ppb).

3°- Conclusions.

Il peut donc éventuellement y avoir production de mycotoxines sur les viandes salées et maturées si des facteurs limitants n'interviennent pas au cours de la maturation (température, activité hydrique, hygrométrie, flore de maturation naturelle). Cependant, aucun de ces facteurs ne suffit à lui seul pour éviter la toxinogenèse.

Dans le cas du jambon de campagne, on peut rencontrer des températures atteignant 28 à 30° C au cours du séchage ; la production de mycotoxines pourra alors être suspectée. En ce qui concerne le saucisson et les salamis, les risques de contamination sont pratiquement inexistants dans les conditions de maturation normalement utilisées en industrie.

Cependant, parmi les moisissures qui constituent la "fleur" du saucisson et celles qui recouvrent la surface des jambons salés, certaines appartiennent à des espèces réputées toxinogènes et pourraient, dans des conditions favorisantes, élaborer leurs mycotoxines. Il est donc intéressant de considérer les divers facteurs susceptibles de limiter la contamination.

IV. MOYENS DE LUTTE CONTRE LA PRESENCE DE MOISISSURES INDESIRABLES A LA SURFACE DES SALAISONS

Outre la contamination possible par les locaux (hâloirs) et l'atmosphère, les épices non stérilisées peuvent aussi être incriminées dans l'apparition de souches toxinogènes sur les produits carnés conservés par salaison. Après avoir éliminé ces facteurs de contamination, un ensemencement par des moisissures choisies et un éventuel fumage préserveront efficacement

les produits. De plus, l'enveloppe du saucisson peut constituer une protection contre la diffusion des mycotoxines dans le substrat.

1°- Utilisation d'épices stérilisées.

De nombreux travaux ont démontré la présence de souches toxinogènes dans les épices non stérilisées. Sur un grand nombre d'échantillons d'épices, HADLOCH [36] et JACQUET [46] retrouvent des Penicillium et des Aspergillus dont A. glaucus, A. flavus, A. fumigatus et A. clavatus. L'analyse de 153 moisissures isolées du poivre noir et appartenant au groupe A. flavus, montre que 30 % de ces souches peuvent former l'aflatoxine, lorsqu'elles sont placées dans des conditions favorables.

SCOTT et KENEDY [83] retrouvent l'aflatoxine dans le poivre de Cayenne naturellement contaminé, à des taux de l'ordre de 8 µg d'aflatoxine B_1 par kilogramme. De plus, deux souches d'A. versicolor productrices de stérigmatocystine ont été isolées du poivre blanc par INCZE et FRANK [45].

D'après ces différentes constatations, on peut penser que les épices jouent un rôle important dans la contamination des produits carnés par les moisissures et principalement par les Penicillium et les Aspergillus qui sont le plus fréquemment décelés dans les salaisons de viandes sèches. On peut donc préconiser l'emploi d'épices préalablement stérilisées, afin de limiter la contamination des produits.

2°- Ensemencement par des moisissures sélectionnées.

Afin d'éviter la présence de moisissures indésirables sur les saucissons, un ensemencement artificiel peut être réalisé, soit par trempage des saucissons dans une suspension de spores, soit par pulvérisation avec des spores sèches. On obtient ainsi une couverture régulière, composée des espèces souhaitées, dans le cas toutefois où une désinfection préalable des locaux a été réalisée et où le stockage des saucissons après fumage est effectué dans de bonnes conditions.

La moisissure choisie pour l'ensemencement dirigé doit répondre à

quelques critères :

- elle ne doit être ni pathogène, ni toxinogène ;
- elle doit avoir une croissance rapide, qui prévient le développement des bactéries et des moisissures indésirables ;
- elle doit former une couche mycélienne suffisamment épaisse, adhérente, régulière, qui conserve une couleur blanche, gris-blanc ou blanc-jaune (selon le type de saucisson) après brossage ;
- la souche utilisée ne doit pas provoquer de décollement du boyau.

Le respect des normes de température, d'hygrométrie et de durée de maturation permet alors l'obtention d'une couverture épaisse et régulière.

Pour donner l'aspect désiré au salami hongrois, les genres Penicillium, Aspergillus et Scopulariopsis sont recommandés. Parmi les Penicillium, les espèces désirables d'après CIEGLER et coll. [14] sont les suivantes : P. expansum, P. miczynskii, P. simplicissimum, P. candidum, P. camenberti, P. commune.

D'après RACOVITA [73], P. expansum répond aux critères cités ci-dessus. Cependant MINTZLAFF [57] s'aperçoit que certains filtrats de cultures de P. expansum sont toxiques pour les animaux et CIEGLER [14] a montré que, sur 40 P. expansum, 3 filtrats de culture contiennent environ 480 ppm de patuline ; pourtant, il ne retrouve pas la toxine sur les saucissons inoculés par ces souches toxinogènes. LIEPE [54], ainsi que MINTZLAFF et LEISTNER (1971-1972), utilisent P. nalgiovensis dans le traitement des saucissons séchés à l'air, pour ses propriétés technologiques et sa non toxicité.

Pour les producteurs de jambons de campagne, les jambons de haute qualité auraient une surface gris-vert, l'organisme responsable étant probablement A. ruber. Mais la croissance de cette moisissure pourraît être simplement un indicateur d'une faible activité hydrique c'est-à-dire d'une longue maturation qui serait la cause réelle de la flaveur désirée.

3°- Le fumage.

La fumée exerce plusieurs rôles sur les viandes salées (PALLU)[65]. Elle a une action chimique, physique et bactériologique : le formol et les com-

posés phénolés apportés par la fumée ont une puissante action bactéricide sur les moisissures aérobies susceptibles de se développer en milieu humide à la surface des pièces. L'action de la fumée retarde ou arrête le développement de "la fleur" sur le boyau des saucisses et saucissons.

INCZE et FRANK [45] étudient l'action de la fumée sur la toxinogenèse. Ils constatent que l'influence du fumage varie selon les souches. Pour certaines, il en résulte une diminution de la toxinogenèse mais, pour d'autres, il n'y a pas de modifications quant à la production de mycotoxines.

Outre son action sur la toxinogenèse, le fumage joue un rôle important au cours de la maturation du produit :

- la fumée provoque une dessiccation plus ou moins profonde des produits au cours du séchage ;

- des transformations physicochimiques de la viande sont occasionnées par suite de l'élévation de la température et des phénomènes osmotiques ou de diffusion qui prennent naissance dans le milieu.

Ainsi, le fumage pourra être considéré comme un facteur de sécurité.

4°- Importance de l'enveloppe du saucisson.

ESCHER [19] a montré qu'il existe un phénomène de diffusion de la toxine, dans le cas des jambons de campagne salés, ensemencés par une souche d'A. ochraceus. Après 21 jours d'incubation, il retrouve 1/3 de l'ochratoxine dans le mycélium et 2/3 ont pénétré dans la viande jusqu'à une distance de 0,5 cm.

Le saucisson, au contraire, peut-il être préservé par son enveloppe ?:

- l'emploi, pour le saucisson, d'enveloppes naturelles ou bien de cellophane, de parchemin, n'assure pas une protection, car le champignon possède une enzyme, la cellulase [53], qui rend l'enveloppe perméable aux mycotoxines ;

- les enveloppes artificielles, étant donné leur faible teneur en eau, ne favorisent pas le développement du champignon. De plus, elles parais-

sent efficaces contre la pénétration du mycélium des Aspergillus, sauf dans le cas où le contact entre l'enveloppe et la mêlée n'est pas parfait [45].

A partir de ces données, certains points peuvent être soulignés. Ainsi, la présence sur les salaisons (de type jambons de campagne, saucissons et lard) de souches d'Aspergillus et de Penicillium toxinogènes a été démontrée avec mise en évidence de la production de mycotoxines sur des milieux de cultures synthétiques appropriés. De plus, certaines mycotoxines ont pu être mises en évidence sur les salaisons, dans le cas toutefois où les conditions de température et d'hygrométrie sont favorables. Il s'agit notamment de l'acide pénicillique, de l'ochratoxine A, de la trémortine, de la citrine, de la patuline, des aflatoxines et de la stérigmatocystine.

Notre travail de recherche se limitera à l'étude de deux mycotoxines : l'ochratoxine A et la patuline. Le substrat choisi sera du saucisson qualifié "pur porc" et embossé dans une enveloppe naturelle.

En ce qui concerne l'ochratoxine A dans les salaisons, comme nous l'avons vu précédemment, un travail a été réalisé sur le jambon de campagne [19], nous indiquant la possibilité de développement de souches d'Aspergillus ochraceus, mais également l'élaboration de la mycotoxine dans le substrat, jusqu'à 7 900 ppb dans des conditions écologiques optimales. Nous nous proposons dans le cas d'échantillons de saucisson contaminés avec des spores d'A. ochraceus d'élucider les points suivants qui constitueront le chapitre III :

- connaître les conditions permettant une production d'ochratoxine A ;
- mettre en évidence une toxinogenèse (même faible) dans des conditions de maturation normalement utilisées en industrie ;
- contrôler la stabilité de la mycotoxine dans le saucisson.

Le chapitre IV sera consacré à la patuline : notre travail consistera à mesurer la stabilité de cette mycotoxine dans le saucisson, puis à mettre en évidence la patuline après inoculation du substrat par des spores toxinogènes de Penicillium granulatum.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE ET LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A, PAR UNE SOUCHE D'ASPERGILLUS OCHRACEUS, ENSEMENCEE SUR LE SAUCISSON

-:-:-

I. Choix d'un mode d'extraction de l'ochratoxine A, à partir du saucisson.

1°- Rappel des propriétés physicochimiques de l'ochratoxine A;

2°- Application de méthodes déjà connues.;

3°- Mise au point d'un mode d'extraction de l'ochratoxine A à partir du saucisson.

II. Etude du développement d'A. ochraceus et production de toxine sur le saucisson.

A. Préparation des échantillons.

B. Recherche des conditions favorables à l'élaboration d'ochratoxine A.

C. Etude des possibilités de production de toxine dans des conditions se rapprochant de celles normalement utilisées en industrie.

III. Etude de la variation du taux de toxine au cours de la maturation.

1°- Variation du taux d'ochratoxine A sur des échantillons de saucisson précontaminés.

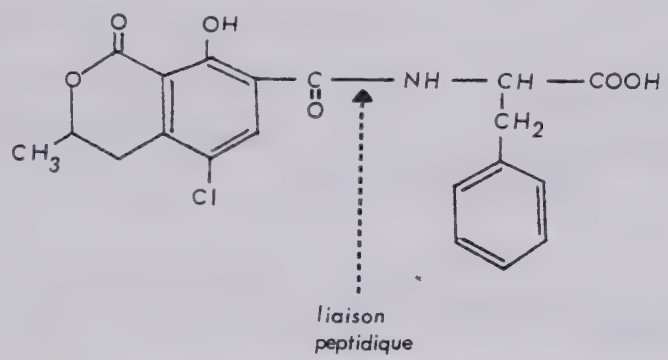
2°- Stabilité de la toxine dans le saucisson.

I. CHOIX D'UN MODE D'EXTRACTION DE L'OCHRATOXINE A A PARTIR DU SAUCISSON

1°- Rappel des propriétés physicochimiques de l'ochratoxine A.

L'ochratoxine A est élaborée par des moisissures appartenant aux groupes Aspergillus et Penicillium, les principales étant A. ochraceus et P. viridicatum. C'est un dérivé toxique de l'isocoumarine. Certaines espèces animales y sont particulièrement sensibles : poulets, agneaux, génisses, porc, le syndrome dominant étant une hépatotoxicose.

L'ochratoxine A est synthétisée à partir d'acétate et de malonyl-Co A; c'est un composé hétérocyclique:



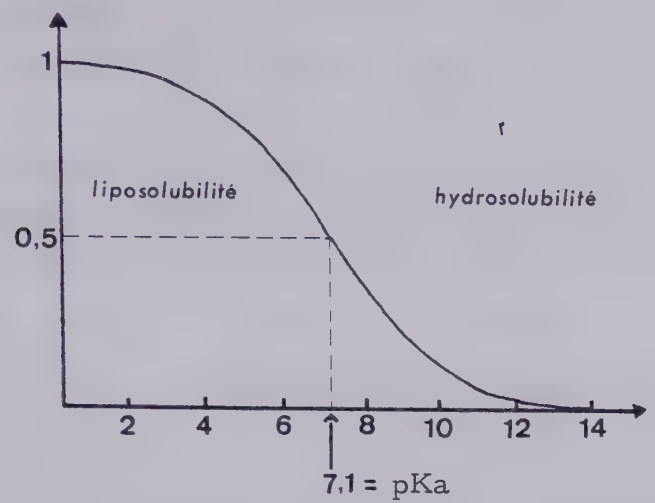
L'acide 7 carboxyl-5 chloro-8 hydroxyl-3, 4 dihydro -3 méthyl isocoumarique est associé à une L-phénylalanine par une liaison peptidique. Cette liaison peut être hydrolysée in vitro et in vivo par la carboxypeptidase A, avec libération de phénylalanine et d'ochratoxine α [31].

- L'ochratoxine A se présente sous forme de cristaux incolores, solubles dans le chloroforme, le benzène, l'éthanol, l'acétone et les solutions alcalines. Son point de fusion se situe aux environs de 94 - 96°C.

- Par ses fonctions phénolique et carboxylique, l'ochratoxine A possède un caractère acide. Son pKa est de 7, 1, ce qui lui confère un caractère hydrosoluble quand le pH est supérieur au pKa et, à pH acide, la toxine sous forme ionisée devient liposoluble.

Deux courbes peuvent être établies :

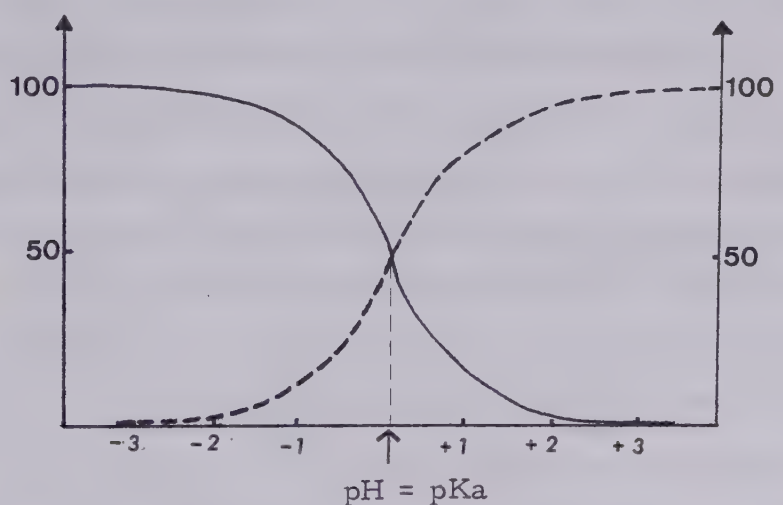
$\frac{C^n \text{ phase organique}}{C^n \text{ phase aqueuse}}$



Courbe 1 : coefficient de partage de l'ochratoxine A.

Représente la concentration de toxine dans la phase organique par rapport à une phase aqueuse, ceci en fonction du pH de cette dernière.

% forme non ionisée % forme ionisée (hydrosoluble)



Courbe 2 : représentation graphique illustrant le pourcentage de forme ionisée de l'ochratoxine A, en fonction du pH.

Remarque : pour une valeur de pH égale à pKa + 1, 90 % de la toxine sont sous forme ionisée, et si pH = pKa + 2, 99 % sont ionisés.

z La molécule possède un comportement chromatographique caractéristique, sur gel de silice en particulier, en couche mince. La propriété intéressante est que l'intensité de fluorescence de la toxine sous lumière ultraviolette est importante. L'excitation à 340 nm entraîne une émission à 475 nm. La fluorescence verte vire au bleu clair après exposition aux vapeurs d'ammoniaque.

Ces caractères physicochimiques de l'ochratoxine A seront mis à profit, lors de l'extraction et de l'identification de la toxine à partir d'échantillons de salaisons crues.

2°- Application de méthodes d'extraction déjà connues.

La recherche et le dosage des mycotoxines consiste à extraire la toxine du produit étudié, aussi quantitativement que possible, puis à éliminer de l'extrait les impuretés gênantes, à séparer la mycotoxine par chromatographie sur couche mince, enfin, à la doser par évaluation de l'intensité de fluorescence [48].

a. Méthodes de mise en évidence d'aflatoxine dans les viandes et les salaisons.

. BULLERMAN et coll. [10] procèdent à une extraction par le chloroforme puis purification par chromatographie sur colonne de gel de silice.

. JEMMALI et MURTHY [47] utilisent une extraction par le méthanol, puis le résidu est traité par le mélange diméthoxyméthane-méthanol qui provoque la précipitation des protéines. Après délipidation par l'hexane, ils transfèrent l'aflatoxine du mélange "méthanol-eau" chauffé, au chloroforme. Les extraits chloroformiques subissent alors une purification sur colonne de gel de silice, avec alumine acide et sulfate de sodium anhydre.

. La méthode utilisée par BROWN et coll. [6] consiste en une extraction par le méthanol et une purification par transfert du méthanol aqueux dans le chloroforme ; puis deux chromatographies sur colonne sont successivement réalisées : l'une sur gel de silice, la seconde sur cellulose et méthanol aqueux.

Dans chacune des trois méthodes, les extraits purifiés sont soumis à une chromatographie en couche mince.

Ces exemples sont susceptibles de nous fournir des éléments adaptables au cas de l'ochratoxine A.

b. Méthodes se rapportant à l'ochratoxine A.

La méthode de CHU et BUTZ [17] relative à la mise en évidence de l'ochratoxine A dans les céréales a été expérimentée pour les salaisons de viandes sèches : 50 grammes de saucisson préalablement contaminés par une quantité connue d'ochratoxine A sont broyés en présence d'un solvant délipidant. Après filtration, la toxine est extraite du substrat par le mélange chloroforme-méthanol. Après évaporation des solvants, le résidu sec est dissous dans du bicarbonate de sodium molaire. En acidifiant à pH 2, la toxine passe sous forme non ionisée, se libère de la phase aqueuse et, ayant acquis des propriétés de liposolubilité, elle sera entraînée par du chloroforme (de nombreux pigménts, des sels, des sucres seront retenus dans la phase bicarbonatée). La phase chloroformique étant évaporée, l'extrait sera traité par chromatographie en couche mince dans le système toluène-acétate d'éthyle-acide formique, dans les proportions 5-4-1. Par comparaison avec une gamme étalon, on peut estimer visuellement les quantités d'ochratoxine A retrouvées, par observation sous lumière ultra-violette (360 nm).

µg d'ochratoxine A ajoutés au saucisson	ppb correspondants	Observation
2,5	50	ND
5,0	100	+
25,0	500	++

L'extrait déposé sur la couche mince étant jaunâtre et visqueux, donc encore trop riche en graisses, un film lipidique s'est formé au cours de la migration du solvant et ne permet pas l'appréciation exacte de l'intensité de

fluorescence de la toxine.

L'intensité du spot 100 ppb est inférieure à celle du spot 500 ppb, ce qui est normal ; à 50 ppb la toxine n'est pas détectable.

Nous avons également testé la technique d'extraction de l'ochratoxine A utilisée par GALTIER [29] pour le sang et les tissus de rat.

L'extraction est réalisée par de l'eau acidifiée et de l'éther diéthylique. Une centrifugation suivie d'une congélation permettent la séparation des graisses et la toxine est entraînée dans la phase éthérée. Après partition contre du bicarbonate de sodium et acidification, l'ochratoxine A libérée est recueillie par du chloroforme. Ce dernier extrait sera soumis à la chromatographie. Mais cette technique a été conçue pour de très faibles quantités de solvant.

Résultats obtenus avec cette méthode:

1/ pour des échantillons de 50 grammes de saucisson :

Ochratoxine A ajoutée (µg)	ppb correspondants	% de récupération
0,75	15	(non détectable)
1,00	20	(trace)
1,50	30	60 %
2,00	40	55 %
2,50	50	55 %
5,00	100	50 %

2/ pour des échantillons de 25 grammes :

Ochratoxine A ajoutée (µg)	ppb correspondants	% de récupération
0,375	15	(non détectable)
0,500	20	(trace)
0,750	30	(trace)
1,000	40	60 %
1,250	50	60 %
2,500	100	60 %

Sur les chromatogrammes, des traces de matières lipidiques interfèrent encore avec la fluorescence de l'ochratoxine A.

Au point de vue efficacité de la méthode, le pourcentage de récupération est satisfaisant (50 à 60 %), mais la toxine n'est pas mise en évidence pour des contaminations inférieures à 30 ppb.

3°- Mise au point d'un mode d'extraction de l'ochratoxine A spécifique d'un substrat riche en lipides (saucisson).

Le problème majeur dans le cas du saucisson est le fort pourcentage de matières grasses qui entrent dans sa composition : de 15 à 35 % selon le degré de séchage.

Deux procédés ont été imaginés pour éliminer ce constituant gênant :

. procédé A : afin d'éliminer les interférences dues aux lipides et aux pigments, on dégraisse au préalable l'échantillon par un passage au Soxhlet, puis, sur le saucisson exempt de matière grasse, la toxine est extraite par les méthodes précitées ;

. procédé B : l'extraction de la toxine est réalisée en traitant l'échantillon par un mélange méthanol-eau car, selon LAFONT qui extrait l'ochratoxine A à partir du fromage, le méthanol semble "écarter" les graisses des autres constituants du substrat. L'opération sera complétée par un dégraissage à l'hexane.

a. Contamination des échantillons.

Des échantillons de 20 grammes de saucisson broyé sont contaminés par ajout d'une quantité connue d'ochratoxine A, en solution dans le chloroforme.

µg de toxine ajoutée au saucisson	ppb correspondants (µg/kg)
0,1	5
0,2	10
0,5	25
1,0	50
2,0	100

b. Extractions comparées.

. Procédé A : l'échantillon est dégraissé au Soxhlet pendant 7 heures, en présence d'éther de pétrole. L'extraction de la toxine est alors réalisée avec 100 ml de chloroforme ; on laisse reposer environ 15 heures à une température de 30 degrés. Après filtration, à la phase chloroformique est ajouté du bicarbonate de sodium (84 g/l) dans lequel la toxine est soluble. La phase bicarbonatée isolée par décantation sera amenée à pH 2 par addition d'acide sulfurique concentré, ce qui provoque la libération de l'ochratoxine A qui sera alors entraînée par du chloroforme ; après évaporation du solvant, on obtient l'extrait A qui pourra être traité par chromatographie.

. Procédé B : l'échantillon contaminé est transféré dans un erlenmeyer, en présence de 200 ml du mélange méthanol-eau (155/45). Après macération pendant 15 heures à 30°C, agitation, filtration et évaporation du méthanol, le résidu aqueux obtenu, auquel on ajoute du bicarbonate de sodium, sera délipidé par 3 fois 100 ml d'hexane. La phase bicarbonatée sera acidifiée et la toxine entraînée par du chloroforme : cela constituera l'extrait B.

c. Chromatographie des extraits A et B, sur couche mince.

Afin de séparer efficacement la toxine des autres composés et pigments, les extraits secs seront traités par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Dans la chromatographie d'adsorption (VERNIN) [98], un composé est partagé entre deux phases : la phase stationnaire, qui est ici la couche mince de gel de silice, et la phase mobile, solvant ou éluant de développement. Au cours de la phase de développement, il y a compétition entre l'éluant et la substance adsorbée sur la surface de l'adsorbant. L'éluant déplace la substance adsorbée selon son pouvoir éluant, sa polarité, et la structure de la substance. Si l'échantillon déposé est un mélange, chaque constituant a un coefficient d'adsorption propre et une affinité déterminée pour le solvant ; il progresse donc avec une vitesse qui est caractéristique de la substance et déterminée par son Rf :

$$Rf : \frac{\text{distance parcourue par une molécule}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

Mais, les Rf sont peu reproductibles, car de nombreux facteurs interviennent dans le processus de chromatographie : adsorbant, activité de la couche, solvants, saturation de la cuve, température, distance parcourue par le front solvant, ligne d'immersion du solvant, technique de développement quantité de soluté déposé et nature des solutés.

Les plaques utilisées pour la chromatographie ont une dimension de 20 sur 20 cm et sont recouvertes par une couche de gel de silice 60 d'une épaisseur de 0,25 mm. L'extrait sec de l'échantillon est dilué dans exactement 100 microlitres de chloroforme et 5, 10 et 20 µl seront déposés à 2 cm de la base de la plaque. Un dépôt d'ochratoxine A s'avère nécessaire pour situer le Rf de la molécule.

Pour le développement du chromatogramme, plusieurs systèmes de solvants utilisés par différents auteurs sont testés :

Systèmes de développement	Références
Ethyl acétate - chloroforme - acide formique (60.40.1)	WILSON, TABOR, TRUCKSESS
Chloroforme - acétone - acide formique (80.20.1)	GALTIER [26]
Benzène - acide acétique (9.1)	EPPLEY (1968), VORTER (1969)
Benzène - acide acétique (8.2)	PITOUT
Benzène - méthanol - acide acétique (24.2.1)	CHU-BUTZ [17]
Toluène - acétate d'éthyle - acide formique (5.4.1.)	VORTER
Benzène - hexane puis toluène - acétate d'éthyle - acide formique (6.3.1) ou benzène - acide acétique (9.1.)	HAGAN, TIETJEN [38]

Après plusieurs essais, il apparaît que, pour l'extrait A, le système toluène-acétate d'éthyle-acide formique (6.3.1) est le plus favorable, le développement du chromatogramme se déroulant en 1 heure. Dans le cas de l'extrait B, le système benzène-acide acétique (9.1) permet une bonne séparation de l'ochratoxine A, pour une durée de migration de 1 h30.

Les chromatographies sont réalisées dans des cuves saturées en solvant de développement, à température ambiante et à l'obscurité.

Interprétation des chromatogrammes.

Après développement, la localisation des constituants peut se faire :

- sous lumière ultra-violette ;
- par pulvérisation d'un réactif chimique approprié ;
- par grattage, élution et analyse spectrale ;
- par photodensitométrie (lecture directe sur plaque)

D'après BECKWITH et STOLOFF [3], la comparaison visuelle, sous éclairage ultra-violet, de l'intensité de fluorescence des taches par rapport à une gamme étalon, peut entraîner des erreurs d'appréciation de 30 %. En effet, plusieurs éléments peuvent être mis en cause : l'appréciation subjective du manipulateur, la difficulté d'évaluation de différentes intensités de fluorescence, le nombre de dilutions ou concentrations de l'extrait souvent rendues nécessaires pour ajuster la concentration en mycotoxine du substrat, à celle des standards.

La technique densitométrique présente l'avantage d'être plus objective et précise : PONS (1966) estime que l'erreur est de 2 à 4 % seulement. De plus, la lecture est plus rapide ; la sensibilité la meilleure se situe entre 10 et 100 µg d'ochratoxine A.

Nous avons utilisé un spectrophotofluorimètre Perkin Elmer MPF III. Après grattage des spots d'ochratoxine A et élution dans du bicarbonate de sodium à 14 g/l, on procède à l'analyse avec une excitation à 340 nm et une émission à 475 nm. Une courbe d'étalonnage entre l'intensité de fluorescence et la concentration en toxine permet de déduire ensuite la teneur en ochratoxine A des extraits obtenus à partir des échantillons du saucisson.

De nombreux essais sont réalisés avec des échantillons de 20 grammes, puis, pour confirmer les résultats obtenus, avec des échantillons de poids supérieur.

d. Résultats.

. Méthode faisant intervenir la délipidation au Soxhlet (procédé A) (cf. tableau page 59).

. Extraction par le mélange méthanol - eau (procédé B) (cf. tableau page 60).

. Procédé A.

Nombre d'échantillons	Poids de l'échant. en g	Contamination ochratoxine A ajoutée : en µg	ppb correspondant	µg de toxine retrouvés (moyenne) et écart-type	% de récupération
17	20	2,0	100	0,79 ± 0,55	45,0 %
18	20	1,0	50	0,45 ± 0,18	43,0 %
14	20	0,5	25	0,30 ± 0,07	54,0 %
12	20	0,2	10	0,166 ± 0,049	82,5 %
5	20	0,1	5	ND ou traces	-
3	30	10,0	333	5,0	50,0 %
3	30	5,0	166	2,0	40,0 %
3	65	10,0	153	1,2	12,0 % (1)

(1) perte importante de toxine, l'échantillon étant réparti dans plusieurs nacelles pour le passage au Soxhlet (environ 400 ml d'éther de pétrole sont utilisés).

. Procédé B.

Nombre d'échantillons	Poids de l'échant.en g	Contamination ochratoxine A ajoutée : en µg	ppb correspondant	µg de toxine retrouvés (moyenne) et écart type	% de récupération
6	20	2,0	100	1,30 ± 0,30	65,0 %
7	20	1,0	50	0,50 ± 0,16	50,2 %
6	20	0,5	25	0,26 ± 0,05	53,6 %
4	20	0,2	10	0,160 ± 0,033	80,0 %
6	20	0,1	5	ND ou traces	-
3	30	10,0	333	6,00	60,0 %
3	30	5,0	166	2,50	60,0 %
3	65	10,0	153	4,50	45,0 %
3	35	0,5	14	0,25	50,0 %
3	35	1,0	28	0,50	50,0 %
3	35	5,0	142	3,00	60,0 %
3	35	10,0	284	6,40	64,0 %

e. Discussion et choix définitif d'un mode d'extraction.

z Résultats obtenus avec les échantillons de 20 grammes.

Dans les deux méthodes, le seuil de détection se situe aux environs de 10 ppb. C'est au niveau du pourcentage de récupération que l'on peut trouver une différence : alors que pour des contaminations faibles, de l'ordre de 10 à 25 ppb, les résultats sont sensiblement identiques, lorsque la contamination est plus importante (50, 100 ppb), la méthode utilisant une extraction par le méthanol fournit de meilleurs résultats : 65 % de récupération contre 45 % seulement avec une extraction selon le procédé A.

z Résultats obtenus avec des échantillons plus volumineux et des ajouts de quantités plus importantes de toxine.

Pour des échantillons de 30 grammes contaminés par 5 à 10 µg d'ochratoxine A, 60 % de la toxine sont retrouvés dans les extraits B alors que pour les extraits A, les taux de récupération sont plus faibles, de l'ordre de 40 à 50 %. La différence s'accentue lorsqu'il s'agit d'échantillons de poids supérieur : au cours des essais réalisés sur 65 grammes de saucisson, contaminés par 10 µg de toxine (ce qui correspond à 153 ppb), l'extraction par le méthanol permet de retrouver 45 % de l'ochratoxine A ajoutée alors que l'extraction par le chloroforme précédée d'une délipidation au Soxhlet n'aboutit qu'à 12 % de récupération ; or, généralement, les échantillons que nous utiliserons pour notre expérimentation auront un poids voisin de 65 grammes.

Il en ressort que nous délaisserons la délipidation au Soxhlet, au profit d'une extraction par le méthanol, suivie d'un dégraissage par partition "bicarbonate contre hexane".

II. ETUDE DU DEVELOPPEMENT DE L'ASPERGILLUS OCHRACEUS ET DE LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A DANS LE CAS DU SAUCISSON

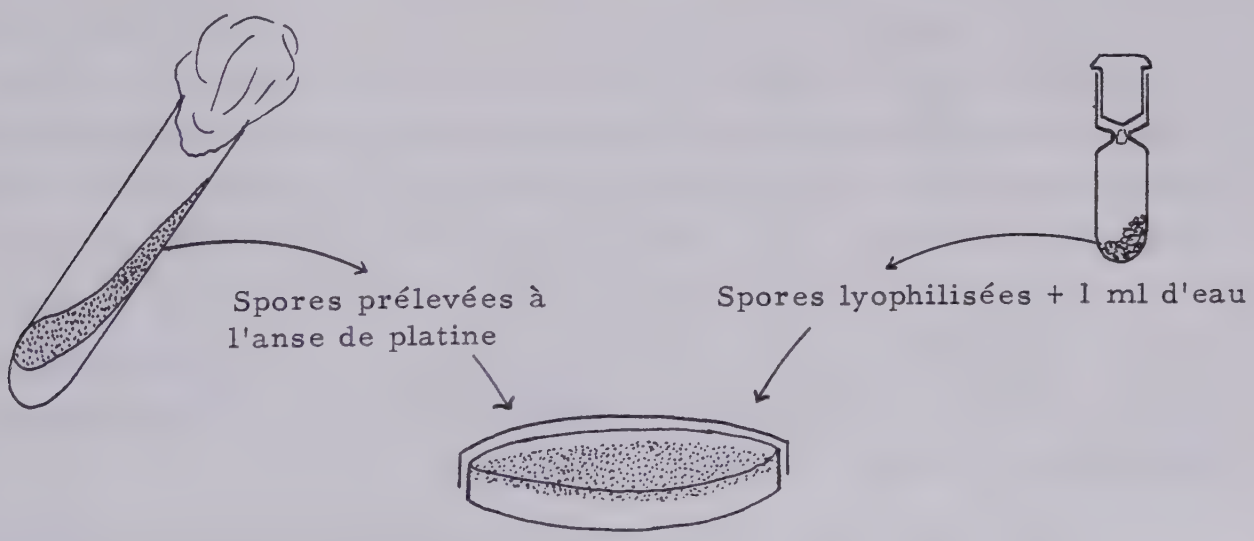
A. Préparation des échantillons de saucisson.

Les principales caractéristiques du groupe Aspergillus ochraceus nous sont fournies par TUITE [97]. Ce sont des Aspergillus à tête conidienne jaune qui virent ensuite au chamois. On les retrouve en majeure partie sur le riz, le poivre et le maïs... Il s'agit de moisissures xérophiles qui se développent à une humidité relative de 80 %. La plupart des espèces de ce groupe fournissent l'ochratoxine A et l'acide pénicillique.

1°- Préparation des spores d'A. ochraceus.

Les souches d'A. ochraceus mises à notre disposition sont conservées sous deux formes : soit par repiquages successifs d'une souche mère sur gélose inclinée, les tubes étant conservés à l'obscurité à une température de 4°C, soit par un procédé de lyophilisation des spores dans du lait écrémé.

a. L'activation des souches est réalisée par ensemencement sur un milieu Czapek gélosé coulé en boîte de Pétri.



Les cultures en boîte de Pétri sont réalisées à 26°C pendant 8 à 10 jours.

b. Les spores produites sont ensemencées sur le saucisson, après avoir été soumises à un contrôle de production d'ochratoxine A.

En effet, nous disposons de plusieurs souches d'A. ochraceus et il convient de sélectionner pour notre étude celles qui élaborent le maximum d'ochratoxine A. Des spores de la culture en boîte de Pétri sont prélevées et transférées dans un milieu de Ferreira liquide, stérile, qui convient parfaitement au développement de la moisissure et à la production de la toxine. La composition de ce milieu est la suivante :

- dihydrogénophosphate de potassium : 1 g ;
- chlorure de potassium : 0,5 g ;
- sulfate de magnésium : 0,5 g ;
- chlorure de fer : 24,4 mg ;
- sulfate de zinc : 22 mg ;
- sulfate de manganèse : 8 mg ;
- sulfate de cuivre : 2,5 mg ;
- phénylalanine : 5 g ;
- extrait de levure : 10 g ;
- glucose : 80 g ;
- eau distillée jusqu'à 1 litre.

Répartir en boîte de Roux, 100 ml de milieu par boîte
Incuber pendant 12 jours, à 26°C : l'A. ochraceus couvre en totalité la surface du milieu et de nombreuses spores ocres apparaissent.
Pour estimer la production de toxine par la souche, 2 échantillons de 1 ml de milieu de culture sont prélevés et analysés comme suit : après dilution dans 5 ml d'eau distillée et acidification à pH 2 par ajout d'acide sulfurique, la toxine est extraite par 10 et 5 ml d'éther diéthylique. La phase éthérée est évaporée puis le résidu sec est repris dans 500 µl, et 20 µl sont déposés sur une couche mince de gel de silice. Le développement est réalisé dans le système toluène - acétate d'éthyle - acide formique (6. 3. 1.). Les chromatogrammes sont interprétés directement au densitomètre Gelman DCD 16 sous lumière ultraviolette de 360 nm ; on utilise la sensibilité 1.

Les résultats sont colligés dans les tableaux suivants (cf. page 64).

Les spores conservées par lyophilisation produisent en moyenne 6 à 10 fois plus d'ochratoxine A. Nous utiliserons donc préférentiellement la souche L 3 qui donne les meilleurs résultats : jusqu'à 380 mg de toxine par litre

de milieu de Ferreira.

Conservation sur gélose inclinée

Notation des souches conservées sur gélose inclinée		Ochratoxine A produite en mg/l
1ere génération	E 1	25
2e génération	E 2a	25
	E 2b	10
	E 2c	10
3e génération	E 3a	50
	E 3b	8
	E 3c	70
4e génération	E 4	4

Spores lyophilisées

Notation des souches lyophilisées	N° des boîtes de Pétri	Ochratoxine A retrouvée en mg/l
L 1	1	30
	2	385
L 2	1	90
	2	40
L 3	1	330
	2	160
	3	380

2°- Inoculation des échantillons de saucisson cru.

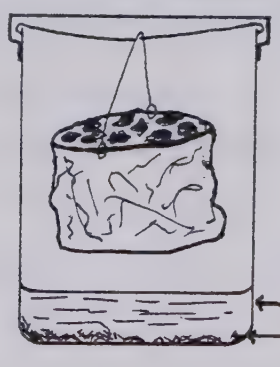
Les spores lyophilisées (notées L 3) sont ensemencées sur Czapek gélosé, en boîtes de Pétri ; le champignon se développe rapidement à 26°C et, après 8 à 10 jours, les nouvelles spores sont formées. Elles sont alors prélevées aseptiquement avec une anse de platine et transférées dans 20 ml d'une solution stérile de Tween 80 à 0,01 % (le Tween, polyoxyéthylène sorbitan monooléate, provoque la dispersion des spores et permet donc l'obtention d'une suspension homogène).

Un millilitre de l'inoculum est étalé à la surface de tranches fraîches de saucisson cru pur porc, de 50 g environ, grâce à un écouvillon stérile.

3°- Culture.

z Description du dispositif utilisé: en se référant à la technique utilisée pour le jambon de campagne par BULLERMAN [9], les tranches de saucisson cru sont suspendues dans des pots de verre de 450 ml, sur des crochets de fer.

z Schéma du dispositif :



L'échantillon est isolé de l'air ambiant par deux épaisseurs de papier filtre Whatman n°1 qui sont fixées par du papier adhésif aux parois de verre. Afin de maintenir une humidité constante à l'intérieur du récipient, nous utilisons une solution avec un excès de sel. Selon le sel utilisé, l'humidité relative obtenue atteint un taux différent. Le tableau suivant nous fournit les principales substances utilisées et les valeurs correspondantes de l'humidité relative.

Préparation d'une atmosphère à humidité constante en récipient clos

Solution aqueuse saturée avec beaucoup de sel en excès		Humidité relative de l'air se trouvant au dessus de la solution (%) 20°C
Carbonate de sodium	$Na_2 CO_3 10 H_2O$	92
Sulfate d'ammonium	$(NH_4)_2 SO_4$	80
Chlorure de potassium	K Cl	86
Chlorure de sodium	Na Cl	76
Nitrate d'ammonium	$NH_4 NO_3$	63
Nitrate de calcium	$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	55
Carbonate de potassium	$K_2 CO_3 2H_2O$	45
Chlorure de calcium	$CaCl_2 6H_2O$	35

Nous pouvons donc réaliser des essais à différentes humidités relatives. Les températures utilisées pourront varier d'une manipulation à l'autre ou même au cours d'une même expérience car de nombreuses étuves sont mises à notre disposition.

A partir de ce dispositif et de ce mode d'inoculation, différents essais vont être réalisés.

B. Détermination des conditions favorables au développement de la moisissure et à sa toxinogenèse, sur le saucisson.

1°- Conditions de culture.

Il faut d'abord établir si le substrat convient à l'Aspergillus ochraceus. Pour cela, nous faisons varier plusieurs paramètres : teneur en eau du saucisson, température, hygrométrie et durée de la culture. Le tableau suivant résume les résultats obtenus dans les différentes conditions (les échantillons utilisés pèsent environ 50 grammes et sont inoculés par une suspension de spores conformément à la description précédente).

a. Observations et résultats.

Caractéristique des échantillons	Nombre d'échantillons	Température en °C	Humidité relative (%)	Durée de la culture	Résultats (moyenne) (en µg de toxine par échantillon)
Saucisson sec, dont on a ôté l'enveloppe	6	26°	75 %	46 j	pas de développement mycélien
	6	17°	75 %	46 j	
Saucisson sec, dont on a conservé l'enveloppe	3	26°	75 %	30 j	pas de développement mycélien
	2	21°	75 %	30 j	
	1	17°	75 %	30 j	
	2	26°	80 %	30 j	
Saucisson venant d'être embossé donc très frais	2	15°	75 %	15 j	ND (pas de mycelium)
	2	22°	75 %	"	" "
	5	22°	80 %	"	2,4 µg (56 ppb)
	4	26°	80 %	"	44 µg (970 ppb)
Saucisson laissé 12 jours à température ambiante donc partiellement sec	6	22°	86 %	20 j	0,5 µg (11 ppb)
	2	26°	80 %	20 j	4,6 µg (100 ppb)
Saucisson laissé 1 mois à température ambiante	2	22°	86 %	20 j	ND
	2	26°	80 %	20 j	ND
Saucisson sec, réhydraté par trempage dans l'eau pendant 5 heures	2	22°	86 %	20 j	ND
	2	26°	80 %	20 j	ND

ND = non détectable.

Un contrôle est également réalisé sur des tranches de saucisson très frais, non inoculées, placées dans des conditions de température et d'hygrométrie favorables à la production d'ochratoxine : Aspergillus ochraceus ne se développe pas sur les échantillons non précontaminés et on ne retrouve pas de toxine après extraction.

b. Discussion.

Les résultats négatifs des premiers essais réalisés à partir d'un saucisson sec, font penser que ce substrat ne convient pas au développement d'A. ochraceus. En effet, malgré l'emploi, pour la culture, de température (26°C) et d'hygrométrie (80 %) habituellement favorables au développement fungique, la germination des spores inoculées ne se produit pas.

Cependant, l'utilisation d'un saucisson frais (venant d'être embossé), nous a permis de constater à la fois un développement mycélien et une production de toxine quand les conditions de culture sont favorables.

. Le degré de séchage du produit constitue donc un critère important. En effet, pour des paramètres (température et hygrométrie) constants, les quantités d'ochratoxine A retrouvées varient selon l'humidité du substrat. Ainsi, un échantillon de saucisson frais permettra une production d'ochratoxine A de l'ordre de 970 ppb alors que, pour un saucisson ayant subi un séchage partiel, nous retrouverons seulement 100 ppb, et lorsque nous utilisons un saucisson très sec, la toxine n'est pas décelable ; le substrat a une teneur en eau insuffisante pour permettre la germination des spores. De plus, le fait de réhumidifier le produit par trempage dans l'eau n'induit pas un développement mycélien après inoculation. Il en ressort que nos expérimentations seront réalisées à partir de saucissons très frais (venant d'être embossé) afin d'obtenir des résultats intéressants, homogènes et reproductibles.

. La température utilisée pour la culture des spores d'A. ochraceus sur le saucisson, intervient pour une large part dans le taux de production de toxine. Le tableau suivant reprend les résultats afin de mettre en évidence d'une part l'influence de la température d'incubation, d'autre part celle de l'état de maturation du produit.

Ainsi, il semble bien qu'une température de 26°C associée à une hygrométrie de 80 % permette l'obtention de quantités importantes d'ochratoxine A (970 ppb) alors qu'à 22°C la production de toxine atteint seulement 56 ppb. Ces résultats sont obtenus pour des échantillons de saucisson frais mais nous constatons

Conditions de culture	Taux d'ochratoxine A mise en évidence (µg/kg)= ppb		
	Saucisson frais	Saucisson mi - frais	Saucisson très sec
26°C et 80 % HR	970	100	-
22°C et 80 - 86 % HR	56	11	-
15°C et 75 % HR	-	-	-

également une différence lorsqu'il s'agit d'un produit partiellement sec : ainsi, nous retrouvons 100 ppb de toxine pour une culture réalisée à 26°C et seulement 11 ppb à 22°C.
Une température inférieure à 15° ou à 17°C ne permet pas le développement mycélien.

. Quant à l'hygrométrie, une valeur comprise entre 80 et 86 % d'humidité relative permet l'élaboration de toxine, si toutefois les autres paramètres sont satisfaisants. Mais nous constatons qu'un taux d'humidité de 75 % est trop faible pour induire la germination des spores. Donc, une hygrométrie de 75 %, associée à des températures inférieures à 15°C, préviendrait tout risque de contamination du produit par des mycotoxines, même s'il s'agit d'un saucisson très frais.

En conclusion, pour obtenir des taux de toxine importants, il faut utiliser pour la culture une température de 26°C et un taux d'humidité relative de 80 %. Mais, comme nous l'avons affirmé, la teneur en eau du substrat constitue un facteur de variation quant à la production de la mycotoxine et il est utile d'établir la relation entre ces deux paramètres : humidité du produit et taux de toxine pouvant être mise en évidence après inoculation et culture dans des conditions favorables. De plus, cette étude permettra de connaître la valeur seuil de l'humidité du produit, au delà de laquelle le développement de l'Aspergillus ne peut se réaliser. D'autre part, une telle expérimentation peut simuler une contamination par A. ochraceus à différents stades de matura-

tion du produit.

2°- Importance de l'H. P. D.

L'humidité du substrat utilisé pour étudier les variations de production d'ochratoxine A, est définie par l'humidité du produit dégraissé (H. P. D.), qui traduit la teneur en eau des constituants non lipidiques de la denrée.

a. Protocole expérimental.

10 saucissons vont subir un séchage d'une durée variable. Les conditions de dessiccation des produits se rapprochent des conditions de séchage utilisées en industrie, car nous disposons d'un séchoir à saucisson équipé d'une ventilation latérale pouvant s'inverser par cycles. Les paramètres choisis sont: température de 15,0 $\pm$ 0,5° C ; degré hygrométrique de 75 %.
Tous les 2 ou 3 jours un saucisson est prélevé :

- une partie est analysée afin de déterminer l'H. P. D. et éventuellement le taux de chlorures ;
- le reste est débité en quatre tranches d'environ 60 grammes qui, après inoculation par une suspension de spores d'Aspergillus ochraceus, sont déposées dans un pot de verre (comme il est indiqué dans la partie précédente), avec une hygrométrie de 80 % et une température de 26°C (ces paramètres correspondant à une production importante de toxine). L'ochratoxine A est recherchée après 12 jours de culture.

z Méthode de dosage de l'H. P. D. et des chlorures.

Afin de déterminer l'humidité du produit dégraissé, deux opérations sont nécessaires : dosage des matières grasses et de la matière sèche.

L'extraction des matières grasses est réalisée sur environ 8 grammes (exactement pesés) de saucisson broyé, mélangés avec du sulfate de sodium anhydre, qui sont dégraissés au Soxhlet pendant 7 heures, par de l'éther de pétrole. Les matières grasses récupérées sont pesées après évaporation du solvant. On obtient alors le pourcentage de matières grasses (M. G.) et, par suite, le pourcentage de matière dégraissée :

$$\% \text{ matière dégraissée} = 100 - \% \text{ M.G.}$$

Les matières sèches sont obtenues à partir d'un échantillon de 5 grammes de saucisson (exactement pesés), broyés dans du sable de Fontainebleau puis déposés à l'étuve à 100°C $\pm$ 1°C pendant 12 à 15 heures jusqu'à obtention d'un poids constant après trois pesées successives. Connaissant le pourcentage de matière sèche (M.S.), le pourcentage d'humidité est donné par la formule :

$$\% \text{ humidité} = 100 - \% \text{ M.S.}$$

L'H.P.D. est le rapport entre ces deux valeurs :

$$\text{H.P.D.} = \frac{\% \text{ humidité}}{\% \text{ de matière dégraissée}} \times 100$$

Le dosage des chlorures est réalisé sur un extrait du produit broyé, par de l'eau chaude. Après défécation et filtration, les chlorures sont dosés par la méthode de Charpentier-Vohlard (dosage par titrage d'un excès de nitrate d'argent par une solution de thiocyanate de potassium M/10) :

$$\% \text{ Na Cl} = \frac{5,85\ (10 - n)}{P}$$

n : étant la quantité de thiocyanate de potassium M/10 (en ml) ;
p : le poids exact de saucisson utilisé (en grammes).

- Contrôle de la production d'ochratoxine A sur les quatre tranches prélevées de chaque saucisson.

L'inoculation des quatre échantillons est réalisée à partir de spores issues de trois boîtes de Pétri (milieu Czapek gélosé) en suspension dans 6 ml de Tween 80 à 0,01 %. Un millilitre de la suspension est étalé sur chaque tranche. Un témoin est réalisé en ensemençant 0,5 ml de la suspension de spores dans deux fioles contenant 60 ml de milieu de Ferreira ; en effet, pour chaque saucisson, les spores utilisées proviendront de boîtes différentes. Les fioles de contrôle sont déposées à 26°C et, après 10 ou 12 jours, 1 ml de milieu est prélevé et l'ochratoxine A est extraite par l'éther diéthylique.

Observations portant sur le développement mycélien et sur la sporulation. Pour les saucissons stockés de zéro à dix jours dans le séchoir, le

phénomène de sporulation apparaît dès le 4e ou le 6e jour après inoculation ;

- sur les échantillons séchés depuis 10 à 20 jours, le mycélium apparaît vers le 5e jour, mais les spores ne se développent que vers le 7e et 9e jour ;
- au delà de trois semaines de séchage, l'Aspergillus ne se développe pas.

b. Résultats.

Voir tableau rassemblant les résultats obtenus, page 73, ainsi que les courbes n° 1 et 2 suivantes.

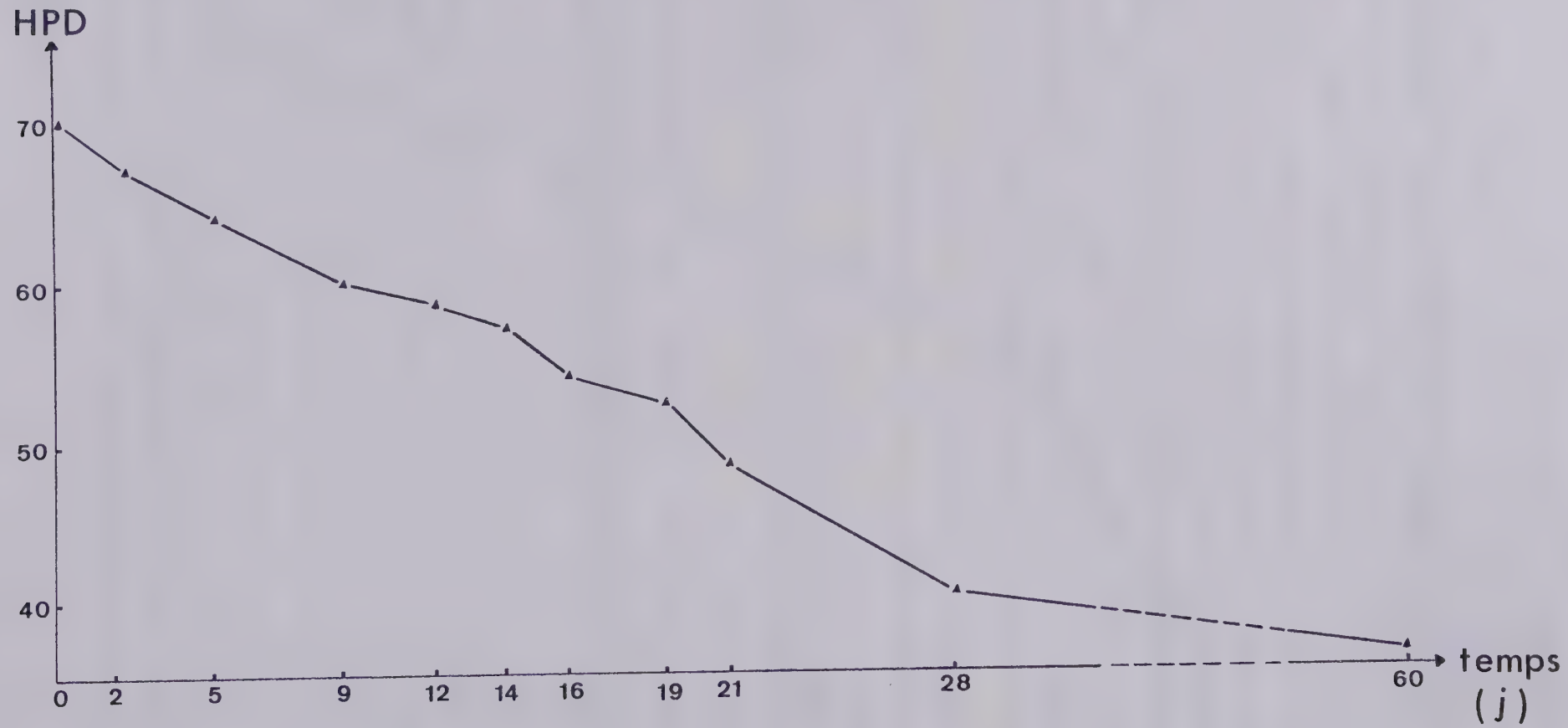
c. Discussion.

. La courbe 1 met en évidence la diminution progressive de l'humidité du produit dégraissé, au cours du séchage: l'H. P. D. d'un saucisson venant d'être embossé est supérieure à 70 ; dès le 2e jour de séchage, elle atteint une valeur de 67,7 ; entre le 7e et le 14e jour, nous observons une légère stabilisation de l'H. P. D. (62 à 58) ; puis elle décroît régulièrement jusqu'au 28e jour de séchage, terme de notre expérimentation en étuve-séchoir, avec une valeur de 40 environ. Cependant, au cours de nos travaux, nous avons constaté que des saucissons laissés à la température ambiante pendant deux mois révélaient une H. P. D. de l'ordre de 37,6. Nous pouvons supposer que la valeur de l'H. P. D. se stabilise aux environs de 37,6 après 2 mois de séchage et peut diminuer très légèrement au-delà de cette période.

. La courbe 2 indique l'évolution de la production de mycotoxine en fonction de l'H. P. D. des échantillons de saucisson ensemencés par des spores d'A. ochraceus et permet de reconnaître un seuil d'H. P. D. rendant le substrat impropre à un développement éventuel de l'Aspergillus.
La production d'ochratoxine A est maximale pour un saucisson très frais : 143 ppb. Nous observons ensuite une décroissance rapide de la toxinogenèse jusqu'à une valeur d'H. P. D. égale à 58, qui correspond à une production d'ochratoxine A de l'ordre de 17 ppb. Le taux de mycotoxine, déjà très bas, diminue alors très lentement. Pour une valeur d'H. P. D. inférieure à 49, l'ochratoxine n'est plus décelable. La valeur 49 constitue l'H. P. D. seuil, au delà duquel le développement de l'Aspergillus n'est plus possible (cela correspond à des échantillons déposés au séchoir pendant 21 jours).

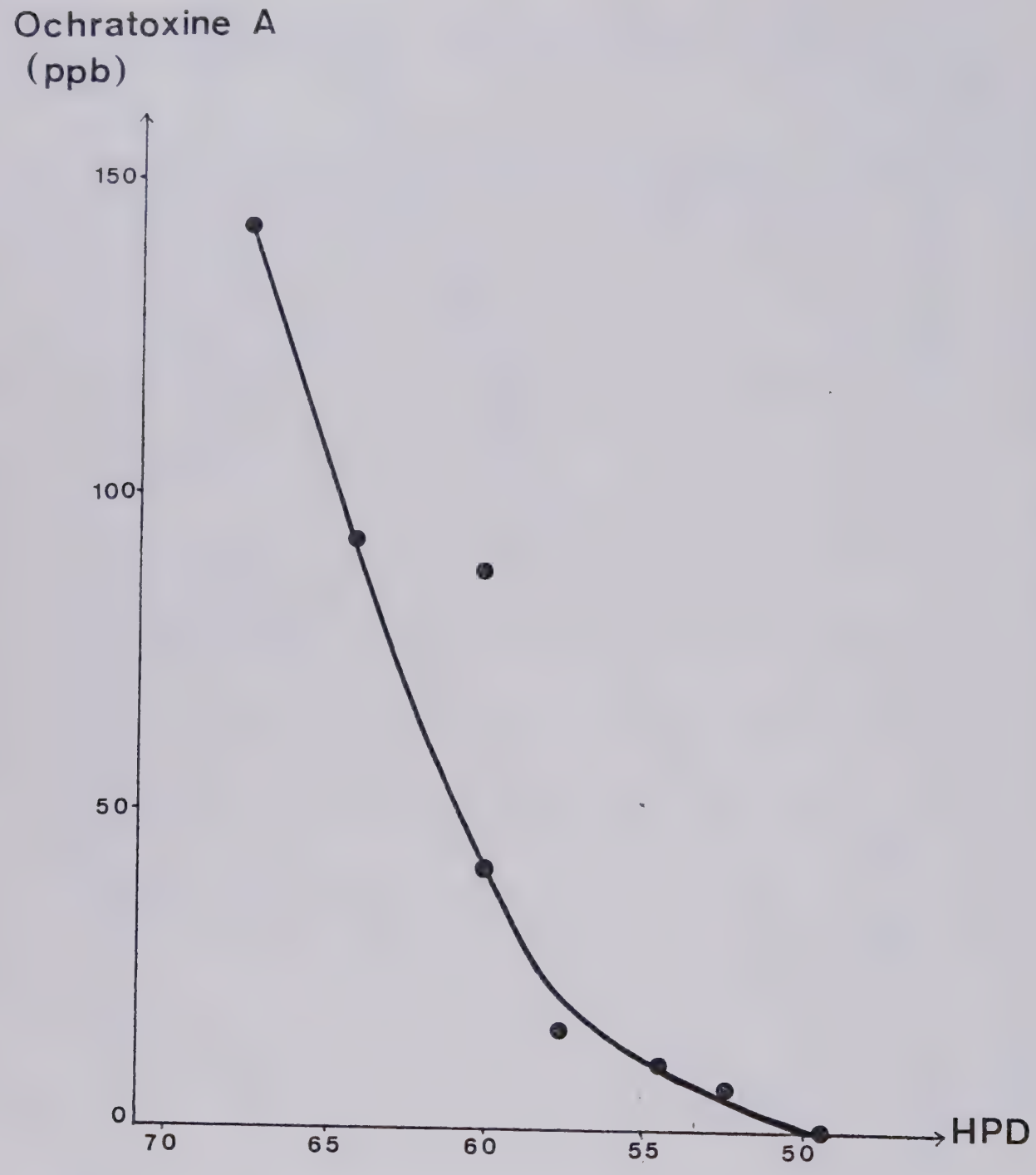
Tableau rassemblant les résultats obtenus.

Durée du séchage à 15°C et 75 % H (en jours)	% humidité	% matière dégraissée	H. P. D.	Poids des échantillons (en g)	Moyenne des résultats d'extraction en µg/échant. durée culture 12 j	ppb correspondant	Contrôle de production de toxine par les spores utilisés pour l'inoculation des tranches (en mg/l)
0	56,57	79,96	70,74	60	2,480	41,33	2,4
2	53,63	79,15	67,76	60	8,600	143,33	2,5
5	47,19	73,12	64,53	60-65	5,640	94,16	7,3
7	44,09	73,18	60,24	65	5,750	88,43	18,0
9	40,42	67,16	60,18	65	2,700	41,52	13,7
12	39,06	66,32	58,89	65			17,0
14	39,57	68,37	57,88	60	1,020	17,00	2,7
16	35,23	64,55	54,58	55	0,700	12,70	4,5
19	34,72	66,14	52,50	50	0,375	7,50	7,0
21	31,25	63,67	49,08	50	traces	< 4,00	7,5
28	28,08	68,61	40,91	55	ND	-	
60	23,47	62,51	37,63	50	ND	-	



COURBE 1

Variation de l'HPD du saucisson au cours de la maturation



COURBE 2

Production d'O.A en fonction de l'HPD du saucisson

Au cours des expérimentations suivantes, nous utiliserons des saucissons venant d'être embossés, afin d'obtenir un maximum de mycotoxine et de mettre plus facilement en évidence des modifications de la toxinogenèse, lorsque varieront les paramètres des cultures.

Les dosages de chlorures montrent que le pourcentage de chlorure de sodium (égal à 2,27 % dans un saucisson frais) augmente au cours du séchage jusqu'à une valeur de 3,48 % pour un saucisson très sec. Il est envisageable que le pourcentage élevé de chlorure, en fin de maturation, nuise également au développement de l'Aspergillus.

C. Etude des possibilités de production de l'ochratoxine A, dans des conditions se rapprochant de celles normalement utilisées en industrie.

Avant d'entreprendre ce travail, il faut rappeler quels sont les paramètres utilisés en industrie.

1°- Schéma des différentes opérations intervenant dans la fabrication des saucissons secs d'après PALLU [65].

Après un repos de la mêlée de 12 à 24 heures, à une température de 4 à 5°C, a lieu l'embossage, suivi ou non d'un saumurage qui favorisera, par osmose, le séchage et la maturation des saucissons.

Puis viennent l'étuvage et le fumage. L'étuvage est une opération qui nous intéresse particulièrement, car c'est à ce niveau qu'interviennent des températures élevées et des hygrométries importantes, qui peuvent induire le développement d'espèces de moisissures indésirables, voire toxinogènes comme l'Aspergillus ochraceus. Pour les saucissons de qualité, l'étuvage dure environ 36 heures : au début, la température se situe entre 22 et 24°C avec une hygrométrie de 90 %, en fin d'étuvage, on atteint 26 à 28°C et 75 à 78 % d'humidité relative. Le saucisson de Lyon est étuvé pendant 36 à 48 heures. Pour la plupart des saucissons, l'étuvage est réalisé à 25°C pendant 24 heures.

Le séchage est réalisé à une température comprise entre 13 et 16°C avec une hygrométrie de 78 à 80 %. La durée de séchage varie selon le type de saucisson considéré ; habituellement, 21 jours sont nécessaires mais, selon la composition et le volume du produit, le temps de séchage peut être

augmenté. Un saucisson normalement sec a une H. P. D. (humidité du produit dégraissé) de 48 à 50 %.

Nous tiendrons compte de ces caractéristiques : température et humidité, pour définir différentes manipulations en vue de vérifier s'il existe un risque de contamination de la denrée et, par suite, du consommateur, dans les conditions normalement utilisées en industrie.

2°- Incidence d'un étuvage à 22°C pendant 1, 2, 3 jours.

Les essais sont réalisés sur des tranches de saucisson de 40 grammes environ, contaminées par des spores d'Aspergillus ochraceus. Les échantillons sont disposés dans des pots contenant 100 ml d'une solution de sulfate d'ammonium en excès, qui maintient l'hygrométrie à 80 % ; ils séjournent à 22°C pendant 1, 2 ou 3 jours ; un contrôle sera réalisé avec un étuvage de 6 jours car, au bout de 5-6 jours, les spores se développent à la surface de l'échantillon. Puis les échantillons sont séchés à 17°C.

L'extraction de la toxine est réalisée après 6, 12, 20 ou 30 jours de séchage.

a. Résultats.

Durée de l'étuvage à 22°C en jours	Ochratoxine A retrouvée en ppb (µg/kg) pour un séchage à 17°C de :				Remarque sur la sporulation
	0	12 jours	20 jours	30 jours	
0		ND	ND	ND	absence de développement
1		ND	ND	ND	absence de développement
2		< 2,5	< 2,5	< 2,5	mycélium apparaît sporulation dès le 7e jour
3		ND	< 2,5	6,25	sporulation à partir du 6e jour
6	28,75	8,75	20,62		sporulation débute le 5e jour
30	26,87				sporulation débute le 5e jour

b. Discussion.

D'après les résultats obtenus, un étuvage de 24 heures à 22°C ne permet pas la mise en évidence d'ochratoxine A ; on remarque qu'une température de 17°C n'induit pas la formation du mycelium.

Lorsque les échantillons sont maintenus 2 ou 3 jours à 22°C, on retrouve la toxine à l'état de traces. Mais, à 22°C, la sporulation apparaît dès le 5e jour et 28,75 ppb de toxine sont mis en évidence. Pour les échantillons laissés à 22°C pendant seulement 2 ou 3 jours, il y a un retard au niveau du développement mycélien ; les spores apparaissent plus tardivement et sont peu nombreuses et la production de toxine s'en ressent.

Un étuvage de 1 jour à 22°C ne permet sans doute pas aux spores de germer et de se développer.

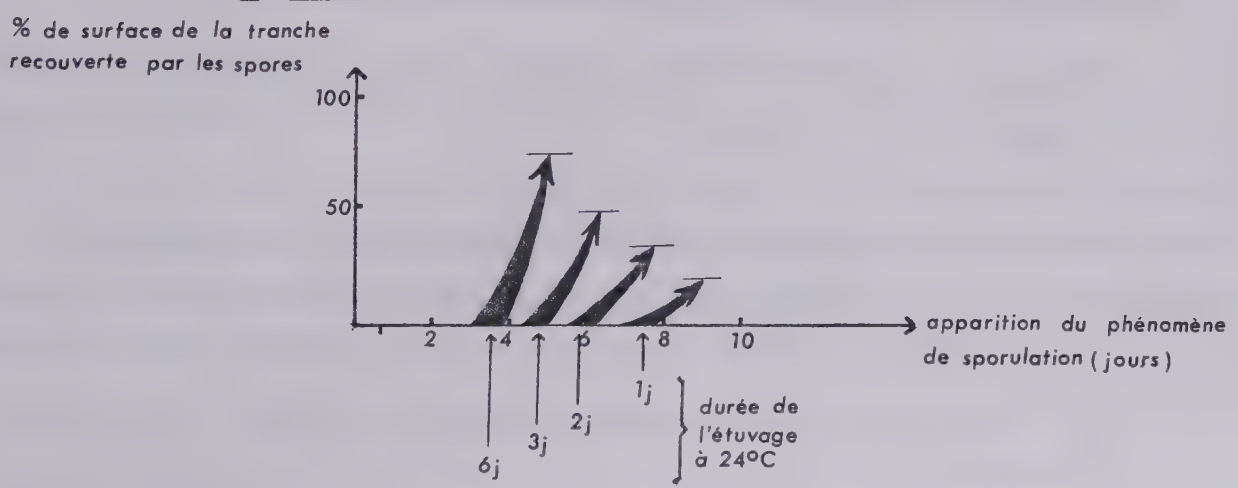
3°- Essais réalisés avec un étuvage à 24°C.

Les échantillons pèsent 40 grammes environ. L'étuvage sera réalisé pendant 1, 2 ou 3 jours. En outre, des essais sont réalisés dans les conditions suivantes :

- absence d'étuvage ; ces échantillons étant utilisés comme contrôle ;

- un étuvage de 6 jours à 24°C, pour déterminer les taux de toxine qui peuvent être atteints à cette température et ainsi apprécier la limitation de production d'ochratoxine, lorsque la durée d'étuvage est plus faible.

a. Observation et évolution du phénomène de sporulation.



Ce graphique, quoique approximatif, met en évidence la période d'apparition des spores en fonction du nombre de jours pendant lequel l'échantillon est maintenu à 24°C. De plus, il permet de constater que la surface du saucisson recouverte par les spores augmente lorsque le temps d'étuvage est plus long.

Sur deux échantillons n'ayant pas subi d'étuvage, placés directement à 17°C avec une hygrométrie de 80 %, l'Aspergillus ne s'est pas développé.

b. Résultats obtenus après extraction de la toxine.

Durée d'étuvage à 24°C, en jours	Durée de séchage à 17°C, en jours	Résultats en µg d'O.A./échant. x	Quantité d'O.A. en µg/kg (ppb)
0	20	ND	-
1	19	0,48	12,0
2	18	0,50	12,5
3	17	0,98	24,5
3	3	1,3	32,5
6	0	11,8	295,0

x : valeur moyenne de 3 échantillons.

c. Discussion.

Nous constatons que la production de toxine suit la même variation que l'intensité de sporulation, en relation avec la durée d'étuvage à 24°C.

Cependant, le passage à 24°C pendant 1 seul jour suffit pour permettre le développement de l'Aspergillus et l'élaboration de quantités de toxine de l'ordre de 12 ppb. Quoique le taux d'ochratoxine A soit faible, nous pouvons conclure que, dans les conditions habituellement utilisées en industrie, la toxinogenèse de l'Aspergillus ochraceus se manifeste, alors qu'à 22°C de faibles quantités de toxine n'étaient mises en évidence qu'après 3 jours d'étuvage.

Si le passage à 24°C se prolonge durant 2 ou 3 jours, la toxinogenèse augmente et atteint 24,5 ppb.

Les contrôles réalisés sur les échantillons laissés à 24°C pendant 6 jours permettent la mise en évidence de quantités 10 fois plus importantes de toxine : 295 ppb, alors que, dans les échantillons laissés 3 jours à 24°C puis 3 jours à 17°C, on retrouve seulement 32,5 ppb de toxine car le développement mycélien est moindre et la sporulation moins importante et beaucoup plus tardive.

Donc, un étuvage à 24°C pendant 1 ou 2 jours permet la mise en évidence d'ochratoxine A. Les quantités retrouvées sont très faibles. Mais, dans l'éventualité d'un passage à 24°C ou à une température plus élevée pendant une période supérieure à 4 jours, au cours d'un accident de fabrication, ou bien dans des préparations artisanales où les températures ne sont pas surveillées, on peut s'attendre à retrouver des taux de toxine importants et donc craindre une contamination (du consommateur), mais également un apport de spores d'Aspergillus sur d'autres denrées alimentaires.

Il faut cependant prendre en considération le fait suivant : pour que la toxine puisse être mise en évidence, un apport massif de spores est nécessaire, de l'ordre de 10^3 à 10^6 pour un échantillon de 100 grammes. Hormis l'apport possible par des épices contaminées ou la proximité de substrats souillés, on ne peut guère concevoir une telle pollution dans les conditions habituelles de travail de l'industrie des salaisons.

Puisque la toxine est mise en évidence dans le saucisson, nous pouvons envisager sa stabilité dans un tel substrat.

III. ETUDE DE LA VARIATION DU TAUX DE TOXINE AU COURS DE LA MATURATION DU SAUCISSON

Le saucisson utilisé possède une enveloppe naturelle. Il peut être utile de connaître sa perméabilité à l'ochratoxine A, afin de préciser si la toxine mise en évidence au cours des expériences précédentes se situe au niveau du mycélium ou si elle diffuse à travers l'enveloppe, dans le substrat.

Cet essai est réalisé sur 3 saucissons de 100 à 150 grammes qui sont inoculés par une suspension de spores d'A. ochraceus, puis placés à l'étuve à 26°C, avec 80 % d'humidité relative, durant 15 à 30 jours, afin de permettre une production suffisante d'ochratoxine A.

L'enveloppe et la mêlée sont traitées séparément et nous obtenons les résultats suivants :

µg de toxine dans l'enveloppe	µg de toxine dans la mêlée
0,95	1,15
0,85	3,00
0,80	1,20

Donc, une partie de l'ochratoxine A produite se retrouve sur l'enveloppe du saucisson avec le mycélium, une autre partie a diffusé et est présente dans la mêlée.

1°- Variation du taux d'ochratoxine A, au cours de la maturation, pour des échantillons contaminés par des spores d'A. ochraceus et placés dans des conditions favorables à la toxinogenèse.

a. Protocole expérimental.

18 tranches de saucisson très frais (H. P. D. = 71,56), pesant environ 50 grammes, sont inoculées puis maintenues à 26°C avec une hygrométrie de 80 %. Deux échantillons non contaminés, mais placés dans les mêmes conditions, nous permettront de doser l'H. P. D. après 10 et 20 jours.

b. Résultats obtenus.

Durée de maturation en jours	µg d'ochratoxine A retrouvés par échantillon +	ppb (µg/kg)	H. P. D.
5	0,28	5,6	
10	0,80	16,0	43,78
15	1,04	20,8	
20	0,52	10,4	34,52
30	1,82	36,4	
40	1,20	24,0	

+ moyenne de 3 échantillons.

Les quantités d'ochratoxine A extraites de ces échantillons varient peu. Or, dans les conditions utilisées (température de 26°C et échantillons de petite taille), le saucisson se dessèche rapidement, ce qui permet de penser qu'à partir de 10 jours de maturation, l'H. P. D. du produit est trop faible pour permettre la germination de nouvelles spores (nous avons constaté au cours d'une étude précédente que l'H. P. D. limite se situait aux environs de 50). L'ochratoxine serait donc élaborée par les champignons déjà développés mais, pour expliquer les faibles écarts obtenus dans cette expérience, une certaine stabilité de la toxine peut être envisagée.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous pouvons imaginer une nouvelle expérimentation.

2°- Contrôle de la stabilité du taux d'ochratoxine A, au cours d'un séchage normal.

a. Protocole expérimental.

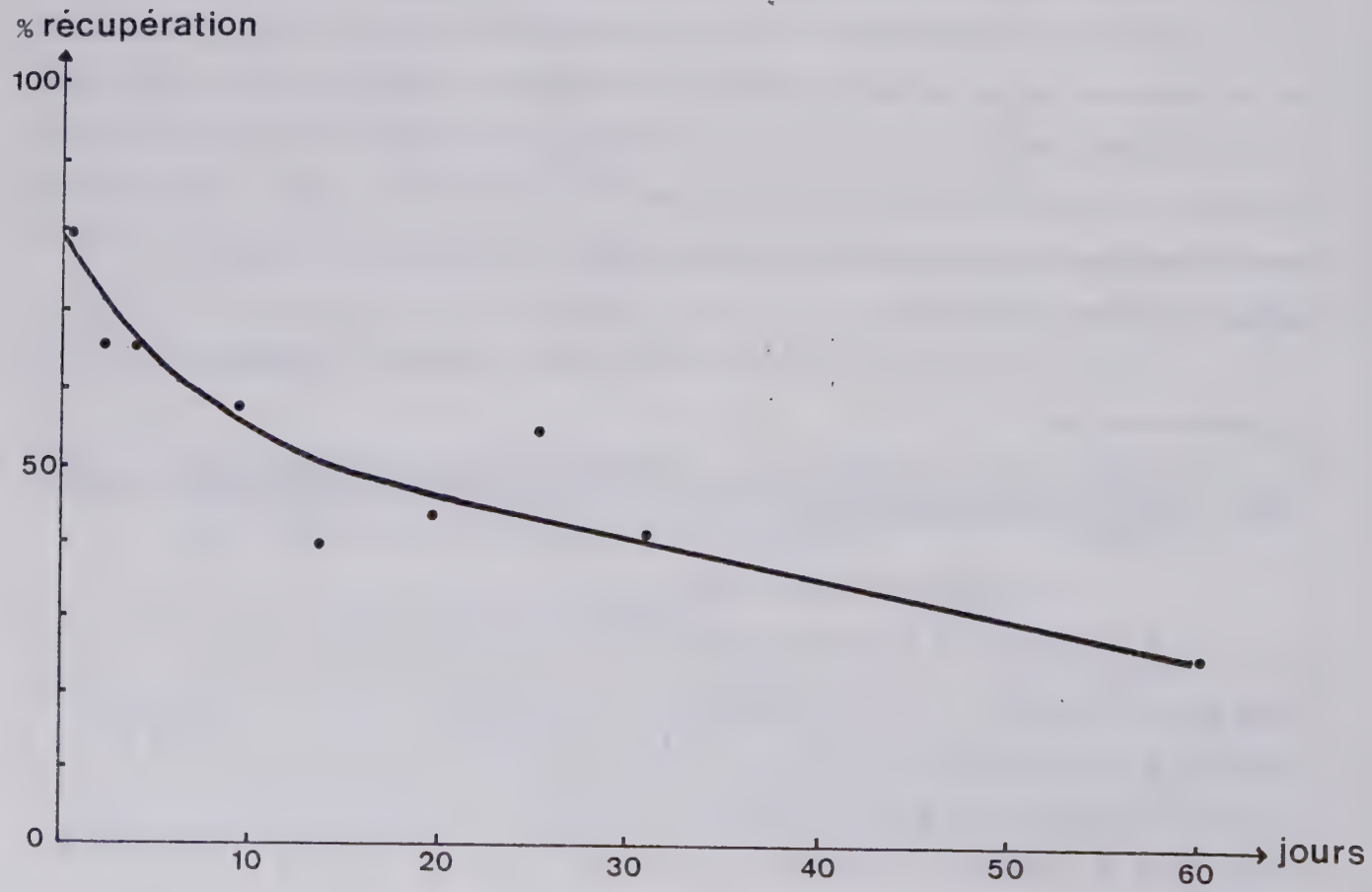
Sachant que la mycotoxine traverse l'enveloppe du saucisson et diffuse dans le produit, nous pouvons envisager d'ajouter une quantité connue d'ochratoxine A à la chair du saucisson, puis le reconstituer. 18 saucisses de 100 g environ reçoivent 20 µg d'ochratoxine A puis sont placées dans le séchoir à 15°C et 75 % d'humidité relative. Les échantillons sont traités ensuite deux par deux, à des temps différents.

b. Résultats.

Durée de passage au séchoir en jours	µg d'ochratoxine A retrouvés par échantillon	% de récupération
0	16,0	80,0
1,5	13,1	65,5
4,0	13,2	66,0
10,0	11,7	58,5
14,0	7,9	39,5
20,0	8,7	43,5
26,0	11,3	56,5
39,0	8,2	41,0
60,0	5,0	25,0

tableau 1

Stabilité de l'ochratoxine A, au cours de la maturation:



Un essai similaire a été réalisé avec des échantillons de 30 grammes de chair de saucisson à laquelle on a incorporé 10 µg d'ochratoxine A et qui sont emballés dans du papier aluminium afin d'éviter le contact avec l'air et la lumière. On les maintient ensuite à 15°C et 75 % d'humidité relative.

Nombre d'échantillons	Durée de stockage du séchoir	% de récupération
2	12 jours	60 % et 70 %
3	32 jours	32, 36 et 30 %

tableau 2

c. Discussion.

Le tableau 1 met en évidence une dégradation progressive de l'ochratoxine A ajoutée au saucisson, mais il s'agit d'un phénomène lent et irrégulier (les points sont dispersés sur la représentation graphique !) ; après 1 mois, nous retrouvons 40 % de la dose initiale et, au bout de 2 mois, 25 % de la toxine sont encore mis en évidence.

Le tableau 2 fournit des résultats similaires, 30 à 36 % de l'ochratoxine ajoutée sont présents dans ces échantillons après un stockage à 15°C pendant 1 mois.

Ces constatations peuvent amener à considérer comme suspects des produits sur lesquels toute trace de mycélium ou de spores ont disparu.

Une contamination de produits d'origine animale conservés par salaison (type saucisson) par l'Aspergillus ochraceus est peu probable. Cependant, les risques encourus ne sont pas inexistants. En effet, comme nous l'avons montré dans ce chapitre, le saucisson constitue dans certains cas un substrat favorable au développement de l'Aspergillus. Ainsi, l'établissement de la relation entre l'humidité du produit dégraissé et la production d'ochratoxine A, permet d'affirmer qu'un saucisson dont l'H. P. D. est supérieure à 60, convient

fort bien au développement mycélien, si toutefois certaines conditions sont réunies : apport important de spores toxinogènes (10^3 à 10^6) par l'atmosphère des hâloirs ou par l'emploi d'épices non stérilisées ; température supérieure à 17°C (pendant une durée suffisante) ; hygrométrie supérieure à 75 %.

Nous avons également constaté que les conditions de température et d'hygrométrie utilisées en industrie permettaient le développement mycélien, accompagné d'une production, quoique très faible, d'ochratoxine A (de l'ordre de 10 ppb), ce qui ne constitue pas un danger réel. Mais nous pouvons supposer que des accidents de fabrication consécutifs à une augmentation de la durée d'étuvage ou bien à l'élévation de la température de maturation, pourraient poser un problème toxicologique. Dans les meilleures conditions de culture (26°C et 80 % d'humidité relative), nous retrouvons des taux d'ochratoxine A supérieurs à 150 ppb, pour des saucissons très frais précontaminés (le taux de toxine dépend également du pouvoir toxinogène de la souche utilisée).

Enfin, il faut souligner que l'élimination des spores indésirables (par brossage ou lavage de la surface des saucissons) ne peut pas rassurer sur l'innocuité du produit, puisque, dans le cas d'enveloppes naturelles, nous avons constaté que la toxine diffuse aisément dans le substrat. De plus, les résultats de notre expérimentation relative à la stabilité de la mycotoxine, suggèrent une très lente modification de la structure moléculaire. Il en résulte donc que les risques de contamination subsistent envers le consommateur.

° ° °

Chapitre IV

RECHERCHES SUR LA PRODUCTION DE PATULINE DANS DES SAUCISSONS CONTAMINES PAR UNE SOUCHE DE PENICILLIUM GRANULATUM

-:-:-

I. Caractéristiques et propriétés de la patuline.

II. Mode d'extraction de la patuline, à partir du saucisson.

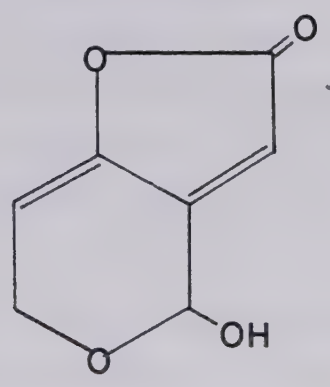
III. Etudes du comportement de Penicillium granulatum, sur un substrat tel que le saucisson.

La patuline, appelée également clavacine, a été découverte en 1942, au cours de la recherche d'antibiotiques nouveaux. C'est un métabolite toxique produit par plusieurs espèces de Penicillium, d'Aspergillus et de Byssoclamys. La liste suivante regroupe les données de plusieurs auteurs [2, 61, 90] :

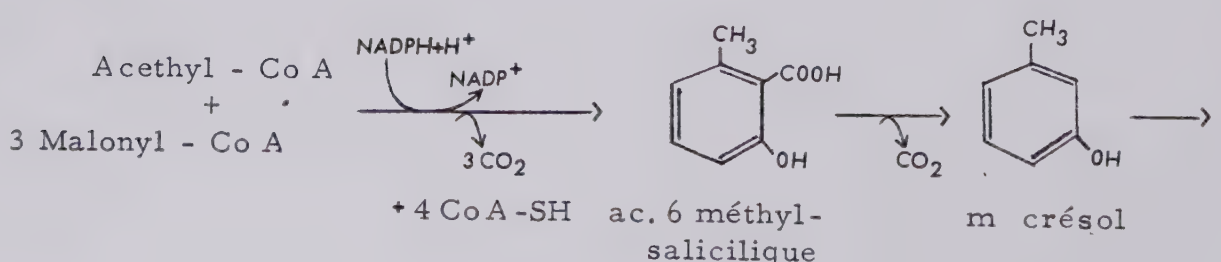
- Penicillium : P. expansum, P. granulatum, P. urticae, P. griseofulvum ; P. claviforme, P. terrestre, P. melinii, P. novae zeelandiae, P. lonasum, P. divergens, P. cyclopium, P. lapidosum, P. leucopus, P. equidum ;
- Aspergillus : A. clavatus, A. giganteus, A. terreus ;
- Byssoclamys : B. nivea et B. fulva.

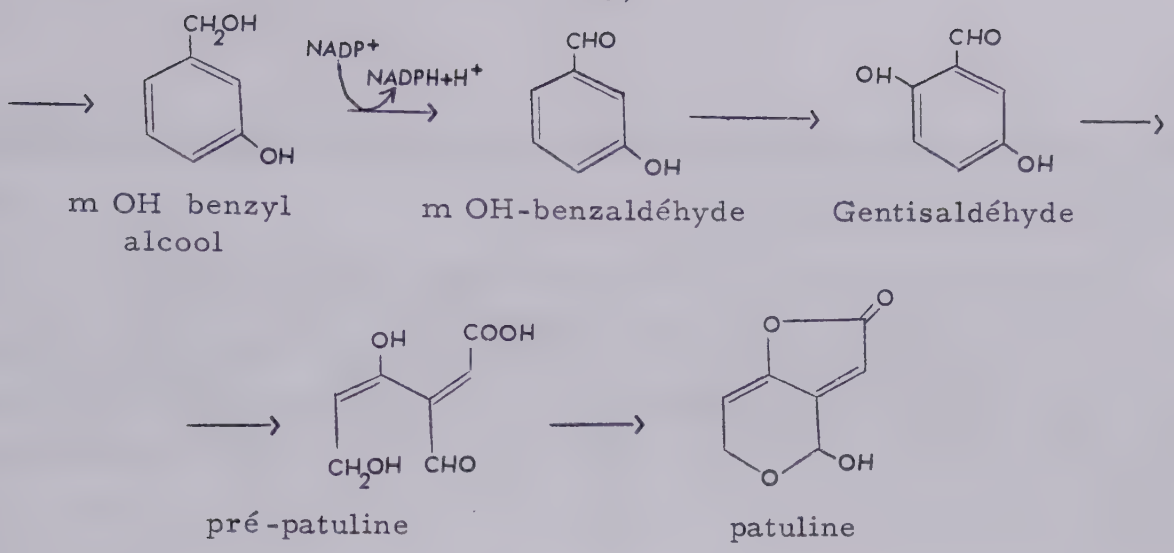
I. CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DE LA PATULINE

La patuline ou 4-hydroxy-4 H-furo [3,2 c] pyran - 2 (6H)-one, est une lactone insaturée. Sa formule a été proposée par WOODWARD et SINGH en 1949.



La biosynthèse de la patuline a été établie par FORRESTER et GAUCHER (1972) par utilisation de glucose marqué au carbone 14:





m OH benzyl alcool — m OH-benzaldéhyde — Gentisaldéhyde

pré-patuline — patuline

1°- Propriétés physicochimiques de la patuline.

La patuline se présente sous forme de cristaux blancs ou incolores, rhombiformes ou prismatiques. Son point de fusion se situe à 110,5°C. En lumière ultraviolette, le maximum d'absorption se situe à 276 nm dans l'alcool.

La patuline est soluble dans l'eau, l'éthanol et les solvants organiques usuels tels que l'éther, le chloroforme, l'acétate d'éthyle sauf l'éther de pétrole.

Sa stabilité à la chaleur a été montrée par PHILPOT, à 100°C pendant 15 minutes, lorsque le pH se rapproche de 2. A pH 5, la stabilité diminue (LOUET).

La molécule est stable en milieu acide ; instable en milieu basique, elle perd son activité biologique.

La patuline est assez stable dans les jus de pomme et de raisin ; il est intéressant de noter toutefois que, dans certaines denrées, la patuline disparaît rapidement.

a. Réaction de la patuline avec les groupements sulfhydryles (-SH)

REISS [76] a montré que la patuline est inactivée par des extraits aqueux de pain de blé, à pH 5. La détoxification de la patuline par le glutathion (G.S.H.) et la cystéine (C.S.H.) suggère que les composés sulfhydryles (-SH)

sont responsables du défaut de détection de cette toxine dans le pain, après un temps d'incubation prolongé.

Temps d'incubation en jours	% de récupération de patuline ajoutée à :		
	Glutathion	Cystéine	Extrait pain
0	100	100	100
2	100		80
4	28	80	40
6	35	20	30
8	1	4	14

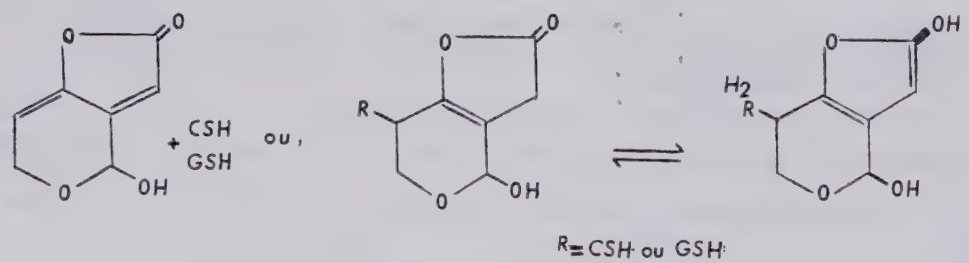
La destruction de la patuline par le glutathion est démontrée pour un pH de 2,3 et de 3,0 par SCOTT et SUMERS.

L'acide thioglycolique et le dimercaptopropanol réagissent également avec la patuline.

Selon GIEGER et CONN [33], la réaction d'addition de la patuline avec les composés SH, prend place sur la double liaison du groupement caractéristique :

$$- CH = CH - CO - \quad \text{(lactone insaturée)}$$

et, HOFFMAN et coll. [42] proposent le schéma suivant :



b. Instabilité de la patuline en présence de SO_2 (dioxyde de soufre)

POHLAND et ALLEN [68] font barboter du SO_2 dans une solution aqueuse de patuline. Après 15 minutes, il y a modification des pics dans le spectre d'absorption. Une exposition plus longue à l'action de SO_2 entraîne une disparition quasi complète de l'absorption, ce qui indique la perte de la fonc-

tion lactone conjuguée et une modification "importante" de la structure moléculaire.

c. La vitamine B_1, inactive la patuline, en solution diluée.

Remarque : la patuline réagit également, en perdant sa toxicité, avec des composés des aliments ne contenant pas de groupements sulfhydriles : peptones, hydrolysat de caséine, sérum, infusion de foie, glycine, méthionine, asparagine, acide para-aminobenzoïque, sulfate de sodium, thiosulfate de sodium, pyrosulfate de sodium [90].

2°- Production de patuline sur un milieu de culture liquide (ESCOULA)[21].

Les spores de P. granulatum sont ensemencées sur un milieu Czapek, auquel sont ajoutés de l'extrait de levure (2g/l) et du glucose (8 g/l) ; la culture se déroule à 26°C durant 15 jours.

L'extraction de la patuline est réalisée comme suit : les milieux de culture sont traités par deux fois 150 ml d'acétate d'éthyle que l'on récupère sur un filtre séparateur de phases. Le filtrat est concentré jusqu'à 15 ml puis traité par chromatographie en couche mince, à l'échelle préparative, sur gel de silice fluorescent à 254 nm. La bande correspondant à la patuline est repérée sous lumière ultraviolette puis éluée sur colonne par l'acétate d'éthyle ; après évaporation du solvant, une cristallisation dans le benzène permettra l'obtention de cristaux blancs de patuline.

Les cristaux de patuline sont conservés à 4°C, à l'obscurité. Des solutions seront réalisées en vue de la contamination d'échantillons de saucissons, mais également pour réaliser des standards et des gammes étalon.

II. MODE D'EXTRACTION DE LA PATULINE A PARTIR DU SAUCISSON

Grâce aux travaux déjà réalisés sur la patuline, nous avons défini un protocole d'extraction convenant à un substrat tel que le saucisson.

1°- Extraction directe par un solvant dans lequel la patuline est soluble.

L'échantillon broyé est traité par de l'acétate d'éthyle. Après filtration et évaporation du solvant, une fraction de l'extrait concentré est traitée par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le développement est réalisé dans le système : toluène - acétate d'éthyle - acide formique (6 - 3 - 1). Mais, le chromatogramme obtenu n'est pas interprétable, compte tenu du pourcentage important de matières grasses dans le saucisson : en effet, des taches étendues et très colorées englobent le point où doit se situer la mycotoxine. Il est donc nécessaire d'éliminer ces substances indésirables.

2°- Purification de l'extrait.

Plusieurs procédés de purification ont été proposés par différents auteurs :

- STOLOFF, NEISHEIM et coll. [89], dans leur test de multidétection appliqué aux graines, isolent le matériel lipidique par l'isooctane, l'extraction étant réalisée par un mélange acétonitrile-eau ;

- POHLAND et ALLEN [67], proposent, pour l'analyse de la patuline dans les graines, une extraction par un mélange acétonitrile-hexane, puis une purification sur chromatographie en couche mince à l'échelle préparative et élution de la bande correspondant à la toxine, sur colonne, par du chloroforme ;

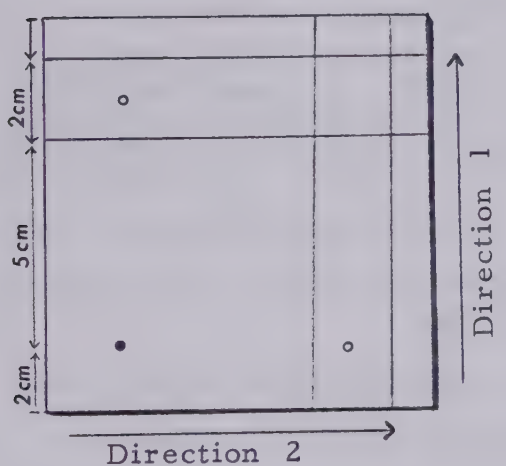
- TAUCHMAN et coll. [93], dans leur technique d'extraction de la patuline dans les viandes, font subir à l'extrait acétonitrile, une purification par élution sur colonne de célite 545 avec de l'hexane (délipidation) puis avec de l'acétate d'éthyle qui entraîne la toxine.

3°- Chromatographie.

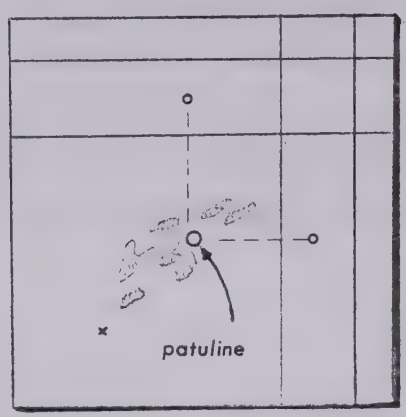
Les extraits obtenus par chacune des méthodes précédentes sont déposés sur une couche mince de gel de silice (0, 5 mm d'épaisseur) imprégné de substance fluorescente (gel de silice 60 F 254) et sont soumis à différents systèmes de solvants de développement.

Système utilisé	Référence
Toluène - acétone - chloroforme (45/35/25)	TAUCHMAN [93]
Toluène - éthylacétate - acide formique (5-4-1) (T.E.F.) (6-3-1)	ESCOULA [20]
1) Benzène - hexane - (délipidant) 2) puis T.E.F. (6-3-1) ou benzène - acide acétique (9-1)	HAGAN [38]
Chromatographie bidimensionnelle : sens 1 : chloroforme-acide acétique -éther éthylique (17-1-3) sens 2 : chloroforme - acétone (9-1)	STOLOFF [89]

Schéma d'une chromatographie bidimensionnelle [89] :



1) Avant développement
- • Dépôt de l'échantillon
- ∘ Standard de patuline.



2) Après développement

Les plaques utilisées, d'une dimension de 10 cm sur 10 cm, sont recouvertes de gel de silice imprégné de substance fluorescente à 254 nm. Le dépôt de l'échantillon est réalisé à 2 cm de la base de la plaque. Deux standards de patuline seront utilisés.

Après développement dans le sens I (le front du solvant ayant parcouru 5 cm), la plaque est extraite de la cuve puis est placée à 80°C pour assurer une évaporation complète des solvants. Ensuite la plaque est développée dans la deuxième direction, dans un nouveau système de solvants.

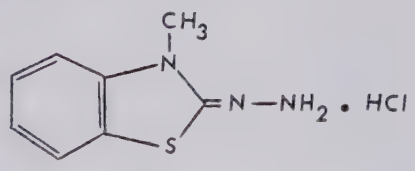
Le chromatogramme est observé sous lumière ultraviolette, à 254 nm. Les standards de patuline apparaissent sombres sur le fond fluorescent de la plaque et l'intersection de deux lignes imaginaires partant des standards et projetées dans chacune des directions du développement, permet de situer la patuline extraite de l'échantillon.

Ce mode de chromatographie a l'avantage de séparer plus efficacement la mycotoxine des différentes substances contenues dans l'extrait.

4°- Identification de la patuline.

Après développement dans les différents systèmes, les chromatogrammes sont d'abord observés sous lumière ultraviolette à 254 nm. Le seuil de détection correspond à environ 0,04 µg de patuline.

La présence de patuline peut être confirmée par pulvérisation de la méthyl-3-benzo-2-thiazolinone hydrazone hydrochloride [M.B.T.H.] à 0,5 % sur le chromatogramme [82].



M.B.T.H. hydrochloride

Après 15 minutes à 130°C, les spots de patuline prennent une coloration jaune que l'on discerne plus aisément sous lumière ultraviolette (360 nm).

La détection limite se situe à 0,01 µg de patuline.

A titre indicatif, nous signalons d'autres produits utilisés par différents auteurs, mais le M.B.T.H. est celui qui permet la mise en évidence des plus faibles quantités de toxine sur le chromatogramme.

Produits utilisés	Seuil de détection	Références
. Solution méthanolique à 1 % d'acide diphénylborique β.amino-éthyl-ester	0,1 µg	TAUCHMAN [93]
. O-dianisidine dans l'acide acétique	0,2 µg	REISS [74]
. p-anisaldéhyde-éthanolique acidique	0,1 µg	SCOTT [79]
. n-méthyl-benzothiazolone (2) hydrazone	0,06 µg	REISS [75]
. Phénylhydrazine	0,02 - 0,05 µg	SCOTT [80]
. Hydroxide d'ammonium à 3 % puis phénylhydrazine à 4 %	0,12 µg	POHLAND [67]

D'après STOTT et BULLERMAN [90]

5° - Observation des chromatogrammes.

Nous constatons tout d'abord, que l'emploi d'une chromatographie bidimensionnelle permet une meilleure séparation de la patuline. La méthode de STOLOFF aboutit à un résidu très chargé en matières lipidiques et doit être abandonnée. Les modes d'extraction utilisés par POHLAND et par TAUCHMAN font intervenir différentes opérations de purification, ce qui diminue d'autant le pourcentage de récupération de la toxine et nous ne retrouvons pas la patuline quand la contamination des échantillons est inférieure à 10 µg (500 ppb pour des échantillons de 20 g de saucisson).

6° - Mise au point d'un mode d'extraction plus efficace.

Compte tenu des résultats obtenus avec les méthodes précédentes et de données bibliographiques complémentaires, nous aboutissons aux conclusions suivantes :

- la patuline est soluble dans l'acétate d'éthyle ;
- la délipidation d'un résidu sec semble plus efficace que celle d'une solution ;
- la toxine est soluble dans l'eau et stable à pH acide ;
- la patuline peut être extraite d'une phase aqueuse par l'acétate d'éthyle (SCOTT) [82].

A partir de ces considérations, il est possible d'élaborer un protocole expérimental convenant plus particulièrement au cas d'un produit gras comme le saucisson. Il semble surtout nécessaire d'accorder une attention particulière à la délipidation.

La patuline contenue dans un échantillon de saucisson préalablement contaminé, est extraite par de l'acétate d'éthyle. Après évaporation de ce solvant, le résidu sec subit un dégraissage par l'éther de pétrole (dans lequel la toxine est insoluble); en présence d'eau distillée amenée à pH 4, par partition contre acétate d'éthyle, la patuline est séparée de la phase aqueuse (laquelle retient de nombreux pigments colorés). L'extrait sec obtenu après élimination du solvant à l'évaporateur rotatif pourra être soumis à la chromatographie.

Dans le cas où le résidu est encore trop chargé en matières grasses et en pigments, une purification sur colonne de gel de silice éluée par un mélange benzène-acétate d'éthyle peut être envisagée.

L'extrait sec est repris dans 200 µl de chloroforme ; des volumes de 2, 5, 10 et 20 µl sont déposés sur la couche mince. Le développement en deux dimensions, dans les systèmes : toluène-acétone-chloroforme (45-35-25) puis toluène-acétate d'éthyle-acide formique (6-3-1), réalisé à température ambiante et à l'abri de la lumière, donne des résultats satisfaisants. Une révélation de la patuline par pulvérisation de M.B.T.H. permet d'estimer, par comparaison à une gamme étalon, un pourcentage de récupération de l'ordre de 60 à 65 %.

Remarque : des essais ont été réalisés en dégraissant au préalable les échantillons au Soxhlet, en présence d'éther de pétrole, mais une perte importante

de patuline est constatée : 10 à 20 % de la toxine ajoutée à l'échantillon sont entraînés dans l'éther de pétrole au cours des 7 heures nécessaires à une délipidation correcte.

a. Choix du protocole expérimental en fonction du pourcentage de récupération de la patuline.

Des échantillons de 20 grammes de saucisson sont contaminés par 5, 10 ou 40 µg de patuline, puis traités selon différents procédés :

- certains sont soumis à une simple extraction (extraction de la patuline par l'acétate d'éthyle ; délipidation et nouvelle partition contre acétate d'éthyle). Ils sont identifiés par la lettre E;
- un dégraissage au Soxhlet précède l'extraction = extraits S E;
- l'extrait E est purifié sur colonne de gel de silice = extraits E C ;
- on fait intervenir une délipidation au Soxhlet, l'extraction, puis une chromatographie de l'extrait sur colonne = extraits S E C.

Résultats :

	Contamination				Remarques
	5 µg (250 ppb)	10 µg (500 ppb)	40 µg (2 ppm)	300 µg (15 ppm)	
E	80 %	70 %	48 %	65 %	Chromatogramme parfois chargé en pigments.
EC	80 %	62 %	45 %		Chromatogramme net. La patuline est correctement individualisée.
SE	Non interprét.	12 %	Non interprét.		La quantité de patuline est difficilement quantifiable.
SEC	Non détectable	5 %	3 %		Le taux de récupération est très bas : pour 5 µg de patuline ajoutés, on ne retrouve rien.

Tableau indiquant les % de patuline retrouvés après les différentes opérations E, EC, SE ou SEC. Les résultats obtenus sont la moyenne de 3 ou 4 échantillons.

Discussion.

Nous constatons qu'un dégraissage au Soxhlet est à éviter : les quantités de mycotoxine retrouvées sont extrêmement faibles et difficiles à estimer, même lorsque nous utilisons une chromatographie bidimensionnelle, car de nombreux pigments masquent la toxine. De plus, la patuline n'est pas mise en évidence pour une contamination de 250 ppb.

Pour nos recherches sur la production de patuline dans le saucisson, nous retiendrons donc le procédé E, car le taux de récupération de la toxine est satisfaisant, de 50 à 70 % selon le taux de contamination ; et même pour des doses très faibles (250 ppb), la patuline est retrouvée. Eventuellement, si l'extrait sec paraît impropre à fournir un chromatogramme correct, une purification sur colonne de gel de silice peut être mise en œuvre. Cette opération supplémentaire diminue très légèrement le pourcentage de récupération, qui n'est plus que de 45 à 65 % environ.

b. Détermination du seuil de détection.

Des échantillons de 20 à 50 grammes sont utilisés pour vérifier plus précisément le seuil de détection de la patuline, par le mode d'extraction sélectionné.

Poids des échantillons en grammes	µg de patuline ajoutés	ppb correspondant	Résultats
20	2	100	Non détectable
20	4	200	+
20	8	400	+
50	3	60	Non détectable
50	5	100	Traces
50	6	120	+

Donc, pour des échantillons de 20 grammes, le seuil de détection se situe aux environs de 200 ppb, et pour 50 grammes de saucisson, 6 µg sont

retrouvés ce qui correspond à 120 ppb.

Il est donc confirmé que la méthode fournit des résultats satisfaisants et nous la retiendrons pour réaliser l'étude de la production de patuline sur des saucissons ensemencés pour une souche de Penicillium granulatum toxinogène.

III. ETUDE DU COMPORTEMENT DE PENICILLIUM GRANULATUM SUR UN SUBSTRAT TEL QUE LE SAUCISSON

1°- Etude du maintien du taux de patuline dans le saucisson.

Cette vérification préliminaire nous est dictée par le fait que CIEGLER ne retrouve plus de patuline dans le saucisson après une durée de 24 heures.

Protocole expérimental.

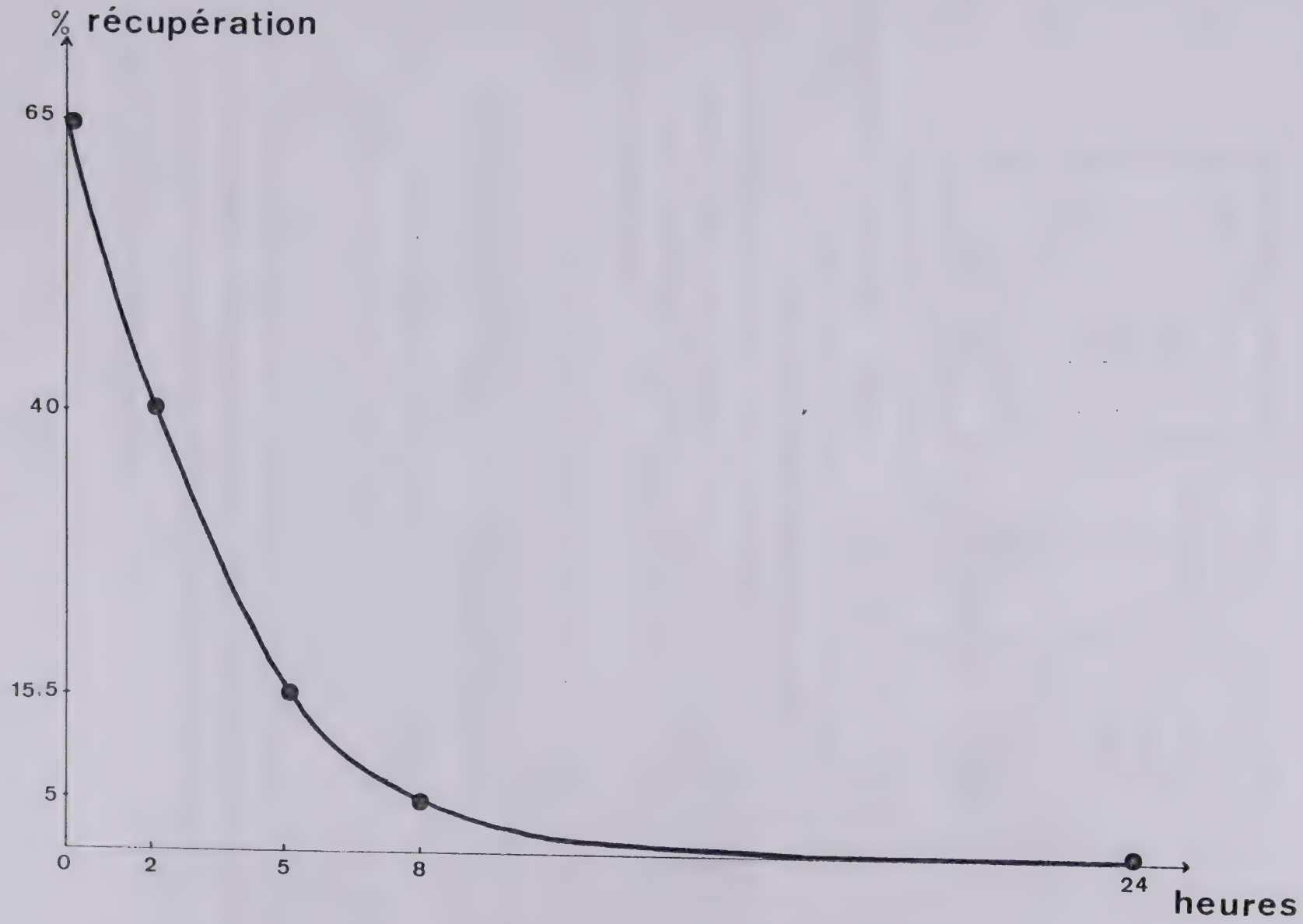
500 µg de patuline sont ajoutés à la mêlée de saucissons de 80 grammes. 18 échantillons sont réalisés et sont alors disposés dans le séchoir, où règne une température de 15°C et une hygrométrie de 75 %. Ils seront prélevés 3 par 3, après 0, 2, 5, 8, 24, 48 heures.

Résultats.

Durée d'incubation (en heures)	Patuline retrouvée (µg)	% récupération
0	325	65 %
2	200	40 %
5	78	15,5 %
8	25	5 %
24	Traces	-
48	N. D.	-

Représentation graphique (cf. courbe page 100).

Nous constatons une décroissance rapide du taux de toxine additionnée à la mêlée. Après une incubation de 2 heures, 40 % sont retrouvés mais, après



Patuline : étude de sa stabilité dans le saucisson

8 heures, le taux de récupération est très faible, de l'ordre de 5 % ; 24 heures après l'ajout de patuline dans le saucisson, la toxine n'est plus décelable par notre méthode d'extraction. Ces données sont en accord avec les résultats de CIEGLER. Les groupements -SH, entrant dans la composition de la mêlée, seraient responsables de modifications de la structure de la patuline par leur action sur la double liaison de la lactone insaturée. Notre technique d'extraction ne permet pas la mise en évidence de la molécule transformée et inactive.

Ces constatations nous conduiraient à penser que les saucissons contaminés par une souche productrice de patuline, constituent des risques d'intoxication très réduits, voire inexistants.

2° - Production de patuline sur des saucissons ensemencés par P. granulatum.

Malgré les résultats obtenus précédemment, des échantillons de saucisson sont ensemencés et mis en culture dans différentes conditions, afin de déterminer si des quantités décelables de toxine peuvent être mises en évidence.

Protocole expérimental.

Des tranches de saucisson frais de 60 grammes, sont badigeonnées par une suspension de spores, à l'aide d'un écouvillon stérile. Les spores proviennent d'une culture de P. granulatum sur un milieu Czapek gélosé. Cette souche produit en moyenne 1,5 grammes de patuline par litre de milieu de culture liquide.

Dans le cas du saucisson, nous ne connaissons pas la température et l'humidité relative convenant le mieux au développement du Penicillium d'une part, et à la production de la mycotoxine d'autre part. Donc, plusieurs essais sont réalisés avec des conditions de culture différentes : nous choisissons trois valeurs de température : 15°, 22° et 26°C, qui seront associées à des hygrométries de l'ordre de 75 %, 80 % et 86 %. L'hygrométrie de 75 % est obtenue par la mise en solution d'un excès de chlorure de sodium ; pour une humidité de 80 %, le sulfate d'ammonium sera utilisé ; enfin, pour réaliser une hygrométrie de 86 %, on emploie une solution de chlorure de potassium.

Ainsi, en associant 2 à 2 températures et hygrométries, nous réalisons 9 essais différents (deux répétitions sont prévues dans chacun des cas).

L'observation des différents échantillons permet de constater que la moisissure s'est développée dans tous les cas, mais occupe une surface plus ou moins importante de l'échantillon, selon les conditions de température et d'humidité dans lesquelles elle se trouve. La croissance mycélienne est augmentée à 26°C et 80 à 86 % d'humidité relative. Pour une température de 15°C, on observe un meilleur développement quand l'hygrométrie est de 86 %.

Résultats.

Après 21 jours de culture, les spores de P. granulatum sont bien développées. La patuline est alors recherchée dans les différents échantillons : la toxine n'est retrouvée qu'à l'état de traces, dans certains échantillons ; pour les autres, elle n'est pas décelable. Les quantités de patuline ne sont pas appréciables et, dans la majorité des cas, on peut affirmer que les taux de mycotoxine dans l'échantillon ne dépassent pas 5 µg (seuil de détection).

Confirmation de ces résultats.

Quelques essais sont réalisés avec des saucissons contaminés par la même suspension de spores de P. granulatum. Les échantillons sont maintenus à 26°C dans une atmosphère contenant 80 % d'humidité relative. L'extraction de la toxine est réalisée après des temps d'étuvage différents : 6, 10, 15, 20, 30, et 40 jours, afin de déterminer si la toxine peut être mise en évidence dans un intervalle de temps précis au cours de la culture.

Observation des échantillons.

Le mycélium se développe par plaques à la surface de la tranche des saucissons. Le phénomène de sporulation débute dès le 5e ou 6e jour, les spores possèdent une teinte bleu clair. Après quelques jours, la surface occupée par les moisissures augmente ; les spores sont plus nombreuses et prennent une nuance grisâtre. Puis il semble que la culture se stabilise ; cela pourrait être dû au fait que le saucisson devient plus sec et est moins propice au développement mycélien et à l'élaboration de patuline.

Nous vérifions en effet que, pour de faibles valeurs de l'H. P. D., la croissance fungique ne peut pas se réaliser, ainsi que nous l'indique le tableau suivant.

H. P. D.	Développement mycélien	Patuline retrouvée
69, 95	+++	Traces de patuline (100 à 200 ppb)
61, 36	+	" ou bien non détectable
52, 96	+	Non détectable
40, 91	-	" "

D'autre part, en mesurant l'H. P. D. d'échantillons de 60 grammes déposés à 26°C et 80 % d'humidité, nous obtenons les valeurs suivantes :

- H. P. D. de 43, 78, après 10 jours ;
- H. P. D. de 34, 52, après 20 jours.

Donc, bien avant le 10e jour de culture, le substrat n'est plus apte au développement du Penicillium. Il est donc normal que les cultures paraissent se stabiliser, seules les moisissures déjà en place peuvent élaborer la toxine.

Les résultats.

L'analyse des échantillons, à intervalles réguliers, révèle dans certains cas de légères traces de patuline. Les taux de toxine présents dans ces tranches de saucissons sont donc dans tous les cas inférieurs à 100 - 120 ppb (qui constitue le seuil de détection pour des échantillons de 60 grammes).

Discussion.

Les résultats obtenus lors de ces deux manipulations, permettent d'affirmer que le saucisson est un substrat qui convient fort bien au développement fongique de la souche de Penicillium granulatum ; cependant, la patuline n'apparaît qu'à l'état de traces dans les échantillons contaminés: les quantités de toxine de l'ordre de 100 à 120 ppb, que nous avons pu mettre en évidence, sont vraiment très faibles et surtout, sont le résultat d'une culture réalisée dans des conditions particulières (la température et l'hygrométrie étant suffisamment élevées).

Afin d'évaluer les risques encourus à la suite de la consommation

éventuelle d'un saucisson contaminé par des spores de P. granulatum, il faut rappeler quelques valeurs de la DL_{50} de la patuline pour la souris, par voie orale, établies par ESCOULA [22] ; chez la souris mâle, la DL_{50} se situe à 36,42 ppm (mg/kg) et chez la souris femelle à 46,31 mg/kg de poids vif. Nous constatons donc que la quantité de mycotoxine retrouvée sur nos échantillons de saucisson, soit 120 µg/kg est très faible par rapport à la valeur de la DL_{50} la souris. L'obtention de taux de patuline aussi faibles résulte de l'inactivation de la molécule par des composants du substrat. ALPERDEN et coll. [1] ainsi que HOFMANN et coll. [42] ont montré que la toxine est inactivée par les composants SH de la viande (les acides aminés soufrés). La réaction d'addition de la patuline et des groupements sulfhydriles s'effectue sur la double liaison du groupement caractéristique de la molécule : -CH = CH - CO [33]. Nos résultats relatifs à la stabilité de la patuline nous indiquent que la détoxification du saucisson est pratiquement totale, après une incubation de 24 heures. De plus, les produits d'addition de la patuline et des composés SH, que nous ne pouvons pas mettre en évidence par nos méthodes d'extraction, son apparemment inactifs [42].

La présence de souches patulinogènes sur l'enveloppe des saucissons ne constituerait pas un danger réel pour le consommateur.

° °

°

CONCLUSION

Les études bibliographiques rapportées dans le chapitre II, ainsi que celles réalisées par BENARD et LABIE [4] puis MOREAU [61] au sujet des moisissures et des mycotoxines dans les salaisons de viandes sèches, permettent de conclure que de nombreuses moisissures toxinogènes (notamment des Aspergillus et des Penicillium) sont présentes à la surface des produits de charcuterie. Or, les conditions de préparation de ces denrées permettent dans certains cas l'élaboration de mycotoxines. Cependant, les mycotoxines diffusent peu dans le produit et, de surcroît, peuvent subir une détoxification (par réaction d'addition avec des composants des produits carnés). MOREAU insiste sur l'hygiène des produits entrant dans la composition des salaisons, ainsi que les locaux de fabrication, ce qui éviterait une importante contamination fongique des salaisons ; les techniques de brossage et de lavage des produits finis sont également à proscrire, car elles augmentent les risques de propagation des spores toxinogènes.

Les expérimentations que nous avons réalisées avec deux souches toxinogènes, Aspergillus ochraceus et Penicillium granulatum, inoculées sur des saucissons crus, ont permis de définir les conditions nécessaires au développement fongique et à la production éventuelle de mycotoxines. La teneur en eau du produit, la température et l'hygrométrie du lieu de stockage jouent un rôle particulièrement important, favorisant ou inhibant la prolifération de la moisissure : ainsi, des doses non négligeables d'ochratoxine A sont obtenues à 26°C et à 80-86 % d'humidité relative, dans le cas toutefois où l'H. P. D. du saucisson est de l'ordre de 65 à 70 ; une H. P. D. inférieure à 50, associée à une température ne dépassant pas 17°C et à une hygrométrie de 75 %, ne permet pas le développement mycélien.

Dans les conditions de fabrication des saucissons utilisées en industrie, l'A. ochraceus et le P. granulatum peuvent donc se développer et les échantillons contaminés peuvent contenir de faibles quantités d'ochratoxine A

(12 ppb) tandis que la patuline n'apparaît qu'à l'état de traces. D'autre part, la patuline est rapidement modifiée par le substrat (sa liaison aux groupements sulfhydriles du saucisson ne permet pas la mise en évidence de la molécule transformée), alors que l'ochratoxine A conserve sa structure et ses propriétés pendant une période plus longue : après 60 jours, 25 % de la toxine sont retrouvés.

Ce travail permet donc d'apporter une réponse quant au pouvoir mycotoxinogène de souches productrices d'ochratoxine A et de patuline sur le saucisson, dans le cas toutefois où l'apport de spores contaminantes est important.

Cependant, l'application de mesures strictes d'hygiène au cours de la fabrication peut abaisser considérablement le taux de contamination des produits finis. Et, sauf dans le cas d'une température ou d'une hygrométrie anormalement élevées, la présence de ces deux mycotoxines n'est pas à redouter dans les salaisons de viandes sèches.

BIBLIOGRAPHIE

[1] ALPERDEN (I.), MINTZLAFF (H.J.), TAUCHMAN (F.) & LEISTNER (L.) - Untersuchungen über die Bildung des Mykotoxins Patulin in Rohwurst. Fleischwirtschaft 1973, 53, 566-568.

[2] BECHET (J.) & THONART (P.) - Les principales mycotoxines et leur importance dans les produits alimentaires. Centre de Documentation Internationale des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles. Série Synthèses bibliographiques 1978, 20.

[3] BECKWITH (A.C.) & STOLOFF (L.) - Fluorodensitometric measurements of aflatoxin thin layer chromatograms. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1968, 51, 602-608.

[4] BENARD (G.) & LABIE (C.) - Moisissures et mycotoxines dans les salaisons de viandes sèches. Rev. Méd. Vét., 1977, 128, 975-995.

[5] BOUTIBONNES (P.), TIFFON (Y.) & AUFFRAY (Y.) - Effect of aflatoxin B_1 on extracellular protease production by Bacillus thuringiensis I.R.C.S. Medical Sciences 1976, 4, 115.

[6] BROWN (N.L.), NESHEIM (S.), STACK (M.E.) & WARE (G.)- Method for the determination of aflatoxin in animal tissue. J. Assoc. Offic. Anal. Chemist 1973, 56, 6, 1437-1439.

[7] BULLERMAN (L.B.) & AYRES (J.C.) - Aflatoxin producing potential of fungi isolated from cured and aged meats. Appl. Microbiol. 1968, 16, 1945-1946.

[8] BULLERMAN (L.B.), HARTMAN (P.A.) & AYRES (J.C.)- Aflatoxin production in meats. I : Stored meats. Appl. Microbiol. 1969, 18, 714-717.

[9] BULLERMAN (L.B.), HARTMAN (P.A.) & AYRES (J.C.)- Aflatoxin in meats. II : Aged dry salamis and aged country cured hams. Appl. Microbiol. 1969, 18, 718-722.

[10] BULLERMAN (L.B.), HARTMAN (P.A.) & AYRES (J.C.)- Extraction and analysis of aflatoxins from cured and aged ham. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1969, 52, 3, 638-641.

[11] BURMEISTER (H.R.) & LEISTNER (L.) - Aflatoxinbildung in Fleischwaren. Fleischwirtschaft 1970, 50, 685.

[12] CAMPBELL (T.C.) & HAYES (J.R.) - Review article : The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1976, 35, 199-222.

[13] CIEGLER (A.) - Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the Aspergillus ochraceus group. Canad. J. Microbiol. 1972, 18, 5, 631-636.

[14] CIEGLER (A.), MINTZLAFF (H.J.), WEISLEDER (D.) & LEISTNER (L.) - Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (salami) - Appl. Microbiol. 1972, 24, 114-119.

[15] CIEGLER (A.), MINTZLAFF (H.J.), MACHNICK (W.) & LEISTNER (L.) - Untersuchungen über das Toxinbildungvermögen von Rohwürsten isolierter Schimmelpilze der Gattung Penicillium. Fleischwirtschaft 1972, 52, 1311-1314.

[16] CIEGLER (A.), BECKWITH (A.C.) & JACKSON (L.K.) - Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine . Appl. and Environmental Microbiol. 1976, 31, 5, 664-667.

[17] CHU (F.S.) & BUTZ (M.E.) - Spectrophotofluorodensitometric measurement of ochratoxin A in cereal products. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1970, 53, 6, 1253-1257.

[18] CHU (F.S.)- Interactions of mycotoxins with substrate molecules and macromolecules. Microbiology 1975, 359-371.

[19] ESCHER (F.E.), KOEHLER (P.E.) & AYRES (J.C.) - Production of ochratoxin A and B on country cured ham. Appl. Microbiol. 1973, 26, 27-30.

[20] ESCOULA (L.) - Moisissures toxinogènes des fourrages ensilés : Présence de patuline dans les fronts de coupe d'ensilages. Ann. Rech. Véter. 1974, 5, 4, 423-432.

[21] ESCOULA (L.) - Moisissures toxinogènes des fourrages ensilés. II : Cinétique in vitro de la biosynthèse de patuline et d'acide byssoclamique par Byssoclamis nivea, en milieu liquide. Ann. Rech. Véter. 1975, 6, 2, 155-163.

[22] ESCOULA (L.) - Moisissures toxinogènes des fourrages ensilés. IV: Production de patuline en milieu liquide par des espèces fongiques isolées des ensilages. Ann. Rech. Véter. 1975, 6, 303-310.

[23] FIEDLER (Von H.) - Schimmelpilzdiagnostik und Mycotoxinnachweis an Fleischprodukten. Archiv. Lebensmittelhygiene 1973, 24, 180-184.

[24] FUJII (K.), HURATA (H.), ODASHIMA (S.) & HATSUDA (Y.) - Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystine in newborn mice. Cancer Research 1976, 36, 1615-1618.

[25] GALTIER (P.) & LE BARS (J.) - Toxines d'Aspergillus ochraceus Wilhem. I : Production d'ochratoxines par des souches isolées de fourrages secs, cultivées sur blé. Ann. Rech. Véter 1973, 4, 3, 487-497.

[26] GALTIER (P.) - Toxines d'Aspergillus ochraceus Wilhelm. II : isolement par chromatographie sur couche mince de l'ochratoxine A obtenue à partir de milieux liquides faiblement concentrés en toxine. Ann. Rech. Véter 1974, 5, 2, 155-166.

[27] GALTIER (P.), MORE (J.) & BODIN (G.) - Toxines d'Aspergillus ochraceus Wilhelm. III : Toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adultes. Ann. Rech. Véter 1974, 5, 2, 233-247.

[28] GALTIER (P.), BODIN (G.) & MORE (J.) - Toxines d'Aspergillus ochraceus Wilhelm. IV : Toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongée chez le rat. Ann. Rech. Véter 1975, 6, 2, 207-218.

[29] GALTIER (P.) - Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal. I : Transport sanguin de la toxine chez le rat. Ann. Rech. Véter. 1974, 5, 3, 311-318.

[30] GALTIER (P.) - Métabolisme et mode d'action de l'ochratoxine A. I.N.S.E.R.M. 1975, 46, 69-78.

[31] GALTIER (P.) et ALVINERIE (M.) - In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. Ann. Rech. Véter. 1976, 7, 1, 91-98.

[32] GALTIER (P.), MORE (J.) & ALVINERIE (M.) - Acute and short-term toxicity of ochratoxin A in 10-days-old chicks. Fd Cosmet. Toxicol. 1976, 14, 129-131.

[33] GEIGER (W.B.) & CONN (J.E.) - The mechanism of the antibiotic action of clavicin and penicillic acid. J. Amer. Chem. Soc. 1945, 67, 112-116.

[34] GUARINO (P.A.) - Microbiology of spices, herbs and related materials. "Fungi and foods" Proc., 7th Ann. Symposium W.N.Y.State Inst. Food Techn. Rochester, oct 19, 1972, 16-18.

[35] HADLOK (R.) - Schimmelpilze bei Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft 1969, 49, 4, 455-460.

[36] HADLOK (R.) - Schimmelpilzkontamination von Fleischerzeugnissen durch naturbelassene Gewürze. Fleischwirtschaft 1969, 49, 1 601-1 608.

[37] HADLOK (R.) - Aflatoxine bei Fleischprodukten und Untersuchungen über die Haüfigkeit der Aflatoxinbildung durch Aspergillus flavus. Stämme. Fleischwirtschaft 1970, 50, 11, 1499-1502.

[38] HAGAN (S.N.) & TIETJEN (W.H.) - A conveniant thin layer chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1975, 58, 3, 620-621.

[39] HALLS (N.A.) & AYRES (J.C.) - Potential production of sterigmatocystin on country cured ham. Appl. Microbiol. 1973, 26, 636-637.

[40] HARWIG (J.), CHEN (Y.K.) - Some conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by Penicilium viridicatum in wheat and barley. Can. J. Plant. Sci. 1974, 54, 17-22.

[41] HAYES (A.W.), NEVILLE (J.A.) & HOLLINGSWORTH (E.B.) - Acute toxicity of rubratoxin B in dogs. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1972, 25, 606-616.

[42] HOFFMAN (K.), MINTZLAFF (H.J.), ALPERDEN (I.) & LEISTNER (L.) - Untersuchungen über die Inaktivierung des Mykotoxins Patulin durch Sulfhydrylgruppen. Fleischwirtschaft 1971, 51, 1534-1536.

[43] HOWARTH (B.) & WYATT (R.D.) - Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability and progeny performance of broiler breeder hens. Applied and Environmental Microbiology 1976, 31, 680-685.

[44] INCZE (K.) & FRANK (H.K.) - Besteht eine Mykotoxingefahr bei der ungarischen Salami ? I : Teil : Einfluss von Substrat, a_w-Wert und Temperatur auf die Toxinbildung bei Miscckkulturen. Fleischwirtschaft 1976, 56, 219-225.

[45] INCZE (K.) & FRANK (H.K.) - Besteht eine Mykotoxingefahr bei der ungarischen Salami ? II Teil : Die Bedeutung der Hülle und der Räucherung. Fleischwirtschaft 1976, 56, 866-868.

[46] JACQUET (J.) & TEHERANI (M.) - Présence exceptionnelle de l'aflatoxine dans certains produits d'origine animale. Rôle possible du poivre. Bull. Acad. Vét. 1974, 47, 313-315.

[47] JEMMALI (M.),& MURTHY (T.R.K.) - A chimical assay method for the determination of aflatoxin residues in animal tissues. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1976, 161, 13-17.

[48] JEMMALI (M.) - Evaluation de différentes mycotoxines (aflatoxines, ochratoxines, zéaralénone) sur couches minces, par fluorodensitométrie par réflectance. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 1974, 14, 4 B, 845-853.

[49] KROGH (P.), ELLING (F.), HALD (B.), JULLING (B.) PETERSON (V.E.)... Experimental avian nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contamined feed. Acta path. microbiol. Scand., Sect. A 1976, 84, 215-221.

[50] KROGH (P.), ELLING (F.), GYRD-HANSEN (N.), HALD (B.), LARSEN (A.E.)... Experimental porcine nephropathy : changes of renal function and structure perorally induced by cristalline ochra-

toxin A. Acta path. microbiol. Scand. Sect. A 1976, 84, 429-434.

[51] LAI (M.), SEMENIUK (G.) & HESSELTINE (C.W.) - Conditions for production of ochratoxin A by Aspergillus species in a synthetic medium. Appl. Microbiol. 1970, 19, 3, 542-544.

[52] LANDERS (K.E.), DAVIS (N.D.) & DIENER (U.L.) - Influence of atmospheric gases on aflatoxin production, by Aspergillus flavus in peanuts. Phytopathology 1967, 57, 1086-1090.

[53] LEISTNER (L.) & AYRES (J.C.) - Molds and meats. Fleischwirtschaft 1968, 48, 62-65.

[54] LIEPE (H.U.) - Luftgetrocknete Wurst mit Kulturschimmel. Erste grosstechnische Erfahrungen. Fleischwirtschaft 1972, 52, 967-968.

[55] MANTHE (P.G.) - Mycotoxines de Claviceps. Mycotoxic Fungi, Myctotoxins, Mycotoxicoses. Willie & Morehouse. Dekker Ed., New-York and Basel 1977, 421-426.

[56] MARTH (E.H.) - Mycotoxins (a review). "Fungi and Foods". Proc. 7th Symp. W.N.Y. State Inst. Food Techn., Rochester, oct. 19, 1972, 8-13.

[57] MINTZLAFF (H.J.) & LEISTNER (L.) - Untersuchung über die Eignung von Penicillium expansum (Link) THOM als Starterkultur für die Rohwurst-Herstellung. Fleischwirtschaft 1971, 51, 1077-1079.

[58] MIROCHA (C.J.), PATHRE (S.V.) & CHRISTENSEN (C.M.) - Fusarium and Stachybotrys mycotoxins. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse Dekker Ed., New-York 1977, 365-420.

[59] MISLIVEC (P.B.) - The genus Penicillium. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse Dekker Ed., New-York 1977, 41-57.

[60] MOREAU (Cl.) - Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson & Cie Ed., Paris 1974, t.I, 471 p. (2e éd.).

[61] MOREAU (Cl.) - Moisissures et mycotoxines dans les viandes et produits de charcuterie. Faculté de Sciences et Techniques, Brest 1978.

[62] MOULE (Y.) & HATEY (F.) - Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from Byssoclamys nivea. Feder. of European Bioch. Societies 1974, 74, 121-125.

[63] NEWBERNE (P.M.) - Biologic effects of plant toxins and aflatoxin in rats. J. Nat. Cancer Inst. 1976, 56, 3, 551-555.

[64] NORTHOLT (M.D.), VERHULSDONK (C.A.H.), SOENTORO (P.S.S.) & PAULSCH (W.E.) - Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. J. Milk Food Technol. 1976, 39, 3, 170-174.

[65] PALLU (R.) - La charcuterie en France. Tome I : Généralités, Charcuterie crue. Pallu Ed., Paris 1956, 151-280.

[66] PHILLIPS (D.L.), YOURTEE (D.M.) & SEARLES (S.) - Short communication : Presence of aflatoxin B_1 in human liver in the United States. Toxicol and Appl. Pharmacol. 1976, 36, 403-406.

[67] POHLAND (A.E.) & ALLEN (A.) - Analysis and chemical confirmation of patuline in grains. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1970, 53, 4, 686-687.

[68] POHLAND (A.E.) & ALLEN (R.) - Stability studies with patuline. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1970, 53, 4, 688-691.

[69] PONS (W.A., Jr.), ROBERTSON (J.A.) & GOLDBLATT (L.A.) - Objective fluorometric measurement of aflatoxins on TLC plates. J. Am. Oil Chemists' Soc. 1966, 43, 665-669.

[70] PRIOR (M.G.), SISODIA (C.S.) & O'NEIL (J.B.) - Acute oral ochratoxicosis in day-old white Leghorns, turkeys and Japanese Quail. Poultry Science 1976, 55, 786-790.

[71] PURCHASE (I.F.H.) & VAN DER WATT (J.J.) - Carcinogenicity of sterigmatocystine to rat skin. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1973, 26, 274-281.

[72] RACOVITA (A.) & RACOVITA (A.) - Die Beimpfung von Dauerwurst mit Schimmelpilzen. Fleischwirtschaft 1968, 48, 893-895.

[73] RACOVITA (A.), RACOVITA (A.) & CONSTANTINESCU (T.) - Die Bedeutung von Schimmelpilzüberzügen auf Dauerwürsten. Fleischwirtschaft 1969, 49, 461-465.

[74] REISS (J.) - Detection of Patuline by thin layer chromatography. Chromatographia 1971, 4, 576-577.

[75] REISS (J.) - N-methylbenthiazolone- (2) - hydrazone as a sensitive spray reagent for Patuline. Chromatographia 1973, 86, 190.

[76] REISS (J.) - Mycotoxins in foodstuffs. VII : Inactivation of Patulin in whole wheat bread by sulfhydryl compounds. Am. Assoc. Cereal Chemists 1976, 53, 2, 150-152.

[77] SCHINDLER (A.F.) - Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. J. of Food Protection 1977, 40, 1, 39-40.

[78] SCHINDLER (A.F.) & NESHEIM (S.) - Effect of moisture and incubation time on ochratoxin A production by an isolate of Aspergillus ochraceus. J.Assoc.Offic. Anal. Chemists 1970, 53, 1, 89-91.

[79] SCOTT (P.M.) & SUMMER (E.) - Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. J. Agr. Food Chem. 1968, 16, 3, 483-485.

[80] SCOTT (P.M.), MILES (W.F.), TOFT (P.) & DUBE (J.G.) - Occurence of patuline in apple juice. J. Agr. Food Chem. 1972, 20, 450-451.

[81] SCOTT (P.M.), LAWRENCE (J.W.) & VAN WALBEEK (W.) - Detection of mycotoxins by thin layer chromatography. Application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol. 1970, 20, 839-842.

[82] SCOTT (P.M.) & KENNEDY (B.P.C.) - Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 1973, 56, 4, 813-816.

[83] SCOTT (P.M.) & KENNEDY (B.P.C.) - Analysis and survey of ground black, white and capsicum peppers for aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56, 1452-1457.

[84] SCOTT (P.M.) - La patuline. I.N.S.E.R.M. 1975, 46, 79-88.

[85] SCOTT (P.M.) - Penicillium mycotoxins. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse. Dekker Ed., New-York 1977, 283-356.

[86] SMALLEY (E.B.) - Slaframin. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse Ed., New-York 1977, 449-457.

[87] SMITH (R.B.), GRIFFIN (J.A.) & HAMILTON (P.B.) - Survey of aflatoxicosis in farm animals. Appl. and Environment Microbiol. 1976, 31, 385-388.

[88] STREZELECKI (E.), LILLARD (H.S.) & AYRES (J.C.) - Country cured ham as a possible source of aflatoxin. Appl. Microbiol. 1969, 18, 5, 938-939.

[89] STOLOFF (L.), NESHEIM (S.), YIN (L.), RODRICKS (J.V.), STACK (M.) & CAMPBELL (A.D.) - A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Ass. Off. Anal. Chem. 1971, 54, 1, 91-97.

[90] STOTT (W.T.) & BULLERMAN (L.B.) - Patulin : A mycotoxin of potential concern in foods. J. Milk Food Technol. 1975, 38, 11, 695-705.

[91] SUTIC (M.), AYRES (J.C.) & KOEHLER (P.E.) - Identification and aflatoxin production of molds isolated from country cured hams. Appl. Microbiol. 1972, 23, 656-658.

[92] TAUCHMAN (F.) & LEISTNER (L.) - Aflatoxinbildung in Rohwurst und Reis in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. Fleischwirtschaft 1971, 1, 77-79.

[93] TAUCHMAN (F.), TOTH (L.) & LEISTNER (L.) - Eine halbquantitative methode für die Bestimmung von Patulin in Fleisch und Fleischwaren. Fleischwirtschaft 1971, 7, 1079-1080.

[94] THACKER (H. L.) & CARLTON (W. W.) - Citrinin mycotoxicosis in the guinea pig. Fd. Cosmet. Toxicol. 1977, 15, 553-561.

[95] THACKER (H. L.) & CARLTON (W. W.) - Ochratoxin A mycotoxicosis in the guinea-pig. Fd Cosmet. Toxicol. 1977, 15, 563-574.

[96] TRENK (H. L.), BUTZ (M. E.) & CHU (F. S.) - Production of ochratoxins in different cereal products by Aspergillus ochraceus. Appl. Microbiol. 1971, 21, 6, 1032-1035.

[97] TUITE (J.) - The genus Aspergillus. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse. Dekker Ed., New-York 1977, 449-457.

[98] VERNIN - Chromatographie en couche mince "techniques et applications en chimie organique". Dunod Ed., Paris 1970.

[99] WHITE (E. P.), MORTIMER (P. H.) & DI MENNA (M. E.)- Sporidesmins. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse. Dekker Ed., New-York 1977, 427-447.

[100] WU (M. T.), AYRES (J. C.) & KOEHLER (P. E.) - Production of citrinin by Penicillium viridicatum on country cured ham. Appl. Microbiol. 1974, 27, 427-428.

[101] WU (M. T.), AYRES (J. C.) & KOEHLER (P. E.) - Toxigenic Aspergilli and Penicillia isolated from aged, cured meats. Appl. Microbiol. 1974, 28, 1094-1096.

[102] YAGEN (B.) & JOFFE (A. Z.) - Screening of toxic isolates of Fusarium poae and Fusarium sporotrichioides involved in causing alimentary toxic Aleukia. Appl. Environmental Microbiol. 1976, 32, 423-427.

[103] YAMAZAKI (M.), MAEBAYASHI (Y.) & MIYAKI (K.) - Production of ochratoxin A by Aspergillus ochraceus isolated in Japan from moldy rice. Appl. Microbiol. 1970, 20, 3, 452-454.

° ° °

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE TOULOUSE

D E C I S I O N

Le Président de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE

VU les dispositions de l'article 10 de l'arrêté du 16 avril 1974 sur le DOCTORAT DE TROISIEME CYCLE

VU le rapport de thèse établi par un des membres du jury

AUTORISE M adame FONTALBAT Sylviane épouse TACHE

à présenter une thèse en soutenance pour l'obtention du grade de DOCTEUR de TROISIEME CYCLE devant un jury composé de :

M. RAYNAUD, Professeur, Directeur de l'E.N.S.A.T. — Président

M. CANDAU, Professeur à l'I.N.P.T.
M. GALTIER, Chargé de Recherche I.N.R.A.
M. LABIE, Professeur à l'E.N.V.T.
M. LABOUCHE, Directeur de Recherche I.N.R.A. — Membres

A TOULOUSE, le 11 septembre 1979
Le Président de l'I.N.P.T.

Professeur G. MONTEL